



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE EDUCAÇÃO FÍSICA E DESPORTOS  
PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* - MESTRADO EM EDUCAÇÃO FÍSICA

**VITOR LOUREIRO DA SILVA**

**EFEITO DO TREINAMENTO FÍSICO SOBRE A FUNÇÃO DO  
CANAL DE CÁLCIO TIPO L MIOCÁRDICO DE RATOS  
OBESOS INDUZIDOS POR DIETA HIPERLIPÍDICA  
INSATURADA**

VITÓRIA  
2015

**VITOR LOUREIRO DA SILVA**

**EFEITO DO TREINAMENTO FÍSICO SOBRE A FUNÇÃO DO  
CANAL DE CÁLCIO TIPO L MIOCÁRDICO DE RATOS  
OBESOS INDUZIDOS POR DIETA HIPERLIPÍDICA  
INSATURADA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
*Stricto Sensu* - Mestrado em Educação Física do Centro  
de Educação Física e Desportos, da Universidade  
Federal do Espírito Santo, como requisito para a  
obtenção do título de Mestre em Educação Física.

**Orientador:** Prof. Dr. André Soares Leopoldo

VITÓRIA  
2015

VITOR LOUREIRO DA SILVA

**EFEITO DO TREINAMENTO FÍSICO SOBRE A FUNÇÃO DO  
CANAL DE CÁLCIO TIPO L MIOCÁRDICO DE RATOS  
OBESOS INDUZIDOS POR DIETA HIPERLIPÍDICA  
INSATURADA**

Aprovada em     /     /

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. André Soares Leopoldo  
Orientador

---

Prof. Dr. Antônio José Natali  
Membro externo

---

Prof. Dr. Edson Castardeli  
Membro interno

---

Prof. Dr. Lucas Guimarães Ferreira  
Membro suplente interno

---

Prof. Dr. Dijon Henrique Salomé de Campos  
Membro suplente externo

## *Dedicatória*

*Dedico esta, bem como minhas demais conquistas, aos meus amados pais (Roberto e Sandra). Sem o apoio e o amor de vocês durante todos os momentos do mestrado, eu jamais teria conseguido alcançar esta vitória. Meu muito obrigado!!! Essa vitória também de vocês!!! Amo muito vocês!!!*

*Às minhas lindas irmãs (Laíne e Lígia), queria agradecer por todas as palavras de carinho e todo o companheirismo durante os momentos difíceis desta caminhada, isso me motivou a continuar na batalha. Também gostaria de agradecer aos meus cunhados (Guilherme e Dumato) pela parceria, conselhos e amizade em todos os momentos.*

*À memória dos meus queridos avós (Jajá e Brasilina), bases de toda a minha educação, sem dúvidas grande parte dessa conquista se deve ao que aprendi no pouco tempo de convívio com vocês. Amo vocês e jamais os esquecerei. Dedico também à minha amada avó que esteve presente durante toda a caminhada (Maria), obrigado por tudo!!!*

## *Agradecimentos*

*A Deus pela existência e possibilidade de concretizar este trabalho.*

*Ao Prof. Dr. André Soares Leopoldo, pela oportunidade, pela amizade, pela paciência e incentivo que tornaram possível a conclusão do mestrado. Será sempre uma grande referência no âmbito pessoal e profissional. Foi uma honra tê-lo como orientador!*

*A Prof. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Lima Leopoldo pelo apoio, orientações e convívio durante todo o período do mestrado. Muito obrigado por tudo!*

*Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Cicogna pela oportunidade de conviver e aprender em seu laboratório. Foi uma honra poder conviver com o senhor. Sem dúvidas foi um dos momentos em que mais cresci como pessoa e profissionalmente. Sempre será um exemplo no âmbito pessoal e profissional. Muito obrigado!!!*

*À Prof. Dr<sup>a</sup>. Ivanita Stefanon com quem tive o privilégio de estar na qualificação, e principalmente por ser um exemplo para mim como educadora.*

*Ao Prof. Dr. Edson Castardeli por ter composto a banca da qualificação. Suas proposições contribuíram para o encerramento do trabalho!!!*

*Ao prof. Dr. Lucas Ferreira, meu orientador na graduação, pela amizade e palavras de incentivo antes e durante o período do mestrado. Você é um exemplo de pessoa, de educador e de pesquisador. Meus sinceros agradecimentos!!!*

*Aos companheiros de laboratório, Artur, Bruno, Barroso, Felipe, Jóctan, Wagner, Vanessa, Suelen e Gisela. Pessoas que se tornaram amigos para toda vida. Obrigado pela contribuição ao meu crescimento pessoal e profissional.*

*Aos companheiros dos laboratórios vizinhos, Vitão, Tchesco, Xuxinha, Grazy, Edna, Prof. Karine, pela amizade e convívio.*

*Às companheiras do Lab Cic., Adriana, Elenize, Damiana, Loreta, Dani Vileigas, Dani Tomaz, Carol Adorni, Scarlet e Paulinha Freire, por toda acolhida e amizade no tempo em que fiquei em Botucatu. Agradeço de coração tudo que fizeram por mim!!!*

*Aos amigos de turma do mestrado, em especial: Gel, Popô, e Vinicius, grande amigos que vou levar para o resto da vida.*

*À Paulinha Grippa, por tudo o que fez por mim, pela parceria durante todo o período de experimento, pela acolhida e suporte quando cheguei a Botucatu. Não tenho palavras para agradecer. Você se tornou uma grande amiga!!!*

*Ao Dijon por ser um grande amigo e sempre se dispor a ajudar em todos os momentos. Obrigado por todo o suporte durante a escrita do projeto de Doutorado,*

*se não fosse você, eu não teria conseguido. Você é demais irmão!!! Agradeço de  
coração!!!*

*À Vanessa, minha grande companheira no período em que estive em Botucatu.  
Não tenho palavras para agradecer todo o seu companheirismo e cumplicidade  
neste período e também depois que voltei a Vitória. Você tem uma enorme parcela  
de contribuição na minha conquista.*

*Às pessoas que me incentivaram a ingressar no mestrado, tios, tias, primos, primas  
e à Lívia. Sem o apoio de vocês não teria encarado e completado com sucesso este  
desafio. A vocês o meu muito obrigado!!!*

*Aos funcionários do Nupem, Ambrosina, Sandra, Zenóbia, Tia Maria,  
Serginho, Diogo e Carol, pela atenção e prontidão em ajudar. Muito  
obrigado!*

*Aos amigos do Laboratório Experimental de Clínica Médica, José Carlos  
Georgette, Mário Bruno, Sueli Clara, Carlão, Ângelo, Rogério Monteiro, Elenize  
Jamas Pereira, Vitor Souza, Antonio Carlos de Lalla, Camila Renata Corrêa, pela  
colaboração e suporte no período em que estive na UNESP- Botucatu.*

*Aos funcionários da secretaria da Pós-graduação, Serginho e Suziane, que com  
muita competência, paciência e bom humor auxiliaram na solução de problemas.  
Obrigado pelo apoio!*

*A todos, que de forma direta ou indireta, colaboraram para  
a concretização desta tese. Muito obrigado!*

## *EPÍGRAFE*

*“É preciso força para sonhar e perceber que a estrada  
vai além do que se vê.”*

*(Los Hermanos)*



## RESUMO

Estudos apontam que a obesidade experimental por 15 semanas promove disfunção miocárdica associada às modificações na função do canal de  $\text{Ca}^{+2}$  tipo L, principal responsável pelo influxo de  $\text{Ca}^{+2}$  para o citosol e gatilho à ativação do trânsito de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular. Estudos propõem que o treinamento físico aumenta a sensibilidade dos miofilamentos ao  $\text{Ca}^{+2}$  e melhora a função das proteínas envolvidas no trânsito de  $\text{Ca}^{+2}$  miocárdico. O objetivo do estudo foi avaliar o efeito do treinamento físico sobre a atividade dos canais de  $\text{Ca}^{+2}$  tipo L miocárdico de ratos obesos. Foram utilizados ratos *Wistar* machos, os quais foram distribuídos em grupos controle (C; n= 40) e obeso (Ob; n= 40). Os ratos C receberam dieta padrão e os Ob um ciclo de dietas hiperlipídicas insaturadas. Após a indução (5 semanas) e a exposição (15 semanas) à obesidade, os ratos foram redistribuídos em mais dois grupos (20ª semana). Assim, o estudo foi composto pelos seguintes grupos experimentais: controle (C; n= 12), controle submetido ao treinamento físico (CEx; n= 14), obeso (Ob; n= 10) e obeso submetido ao treinamento físico (ObEx; n= 11). Os perfis nutricional e metabólico, a pressão arterial, as características morfológicas cardíacas e a função miocárdica foram avaliados. O exercício físico diminuiu o peso corporal (Ob:  $622 \pm 48$ ; ObEx:  $553 \pm 47$  g;  $p < 0,01$ ), a gordura corporal (Ob:  $57 \pm 3,1$ ; ObEx:  $29,4 \pm 3,0$  g;  $p < 0,01$ ) e o índice de adiposidade corporal (Ob:  $9,2 \pm 0,5$ ; ObEx:  $5,3 \pm 0,5$  g;  $p < 0,01$ ) dos ratos ObEx. O grupo Ob apresentou valores de coração total, ventrículo direito e suas respectivas relações com a tibia aumentados em comparação ao grupo C. O mesmo resultado foi observado no grupo ObEx em relação ao CEx. Os músculos papilares dos animais dos grupos experimentais apresentaram comportamento similar em condição basal e após as manobras de potenciação pós-pausa e elevação de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular. Após o bloqueio com *diltiazem*, a atividade dos canais de  $\text{Ca}^{+2}$  tipo L foi similar entre os grupos experimentais (% de bloqueio da TD: C:  $86,9\% \pm 6,27$ ; Ob:  $87,0\% \pm 6,54$ ; CEx:  $87,5\% \pm 5,3$  e ObEx:  $90,6\% \pm 3,95$ ). Em conclusão, a obesidade promove adaptações morfológicas cardíacas sem prejuízos na função miocárdica e atividade dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L. Além disso, o treinamento físico, apesar de modificar a composição corporal, não altera as características morfológicas e funcionais do coração, bem como não acarreta adaptações na função dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L.

**Palavras-chave:** Dieta hiperlipídica, obesidade, exercício físico, coração trânsito de cálcio, canal de cálcio tipo L.

## ABSTRACT

Studies indicate that obesity for 15 weeks promotes myocardial dysfunction associated with changes in the function of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel, main responsible for  $\text{Ca}^{2+}$  influx into the cytosol and trigger the activation of transit of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ . Studies propose that exercise training provides increased sensibility of myofilaments to  $\text{Ca}^{2+}$  and improves the function of proteins involved in myocardial transient of  $\text{Ca}^{2+}$ , including the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels. The study aim was to evaluate the effect of exercise training on myocardial L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel activity in obese rats induced by unsaturated high-fat diet. Male *Wistar* were used. Initially, they were divided in control (C; n = 40) and obese (Ob; n = 40) groups. The C rats received a standard diet and Ob cycle of unsaturated high-fat diets. After processes of induction (5 weeks) and exposure (15 weeks) obesity, mice were redistributed in more two groups (20 weeks). Thus, the study was composed of the following experimental groups: control (C; n = 12), subjected to control exercise training (CEx; n = 14), obese (Ob; n = 10) and obese subjected to exercise training (ObEx; n = 11). The nutritional and metabolic profiles, blood pressure, cardiac morphological characteristics and myocardial function of the animals were assessed. The exercise decreased body weight (Ob:  $622 \pm 48$ ; ObEx:  $553 \pm 47$  g;  $p < 0.01$ ), body fat (Ob:  $57 \pm 3.1$ ; ObEx:  $29.4 \pm 3.0$  g;  $p < 0.01$ ) and the adiposity index (Ob:  $9.2 \pm 0.5$ ; ObEx:  $5.3 \pm 0.5$  g;  $p < 0.01$ ). The Ob group presented values of total heart, right ventricle and their relations with tibia increased in comparison to C group. The same result was visualized in ObEx group in relation to CEx. The papillary muscles of animals showed similar behavior at baseline and after maneuvers of post-rest contraction and elevation of  $\text{Ca}^{+2}$  extracellular. After inhibition of myocardial L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel activity by *diltiazem*, the values of studied variables was similar. In conclusion, obesity promotes cardiac morphological adaptations without impairments in myocardial function and L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels activity (% inhibition of DT: C:  $86,9\% \pm 6,27$ ; Ob:  $87,0\% \pm 6,54$ ; CEx:  $87,5\% \pm 5,3$  e ObEx:  $90,6\% \pm 3,95$ ). In conclusion, obesity promotes cardiac morphological adaptations without impairments in myocardial function and L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel activity. Furthermore, exercise training, in spite of modifying body composition, does not alter morphological and functional characteristics of the heart, as well as, does not promotes adaptations on L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel function.

**Keywords:** High-fat diet, obesity, exercise training, myocardial calcium transient, calcium L-type channel.

**LISTA DE QUADROS**

**Quadro 1.** Composição dos macro e micronutrientes das rações (%) ..... 23

**Quadro 2.** Perfil de ácidos graxos saturados e insaturados das rações (%) ..... 24

**Quadro 3.** Protocolo de Treinamento ..... 26

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação esquemática do delineamento experimental do trabalho.....	21
<b>Figura 2.</b> Representação esquemática do critério utilizado para composição dos grupos controle e obeso antes da redistribuição dos grupos quanto à ausência ou presença do treinamento físico.....	25
<b>Figura 3.</b> Representação esquemática da curva de contração isométrica.....	33
<b>Figura 4.</b> Caracterização do momento inicial da obesidade.....	37
<b>Figura 5.</b> Evolução do peso corporal durante o período de exposição à obesidade.....	38
<b>Figura 6.</b> Evolução do peso corporal durante o protocolo de treinamento físico.....	39
<b>Figura 7.</b> Pressão arterial sistólica, obtida a partir da pletismografia de cauda.....	43
<b>Figura 8.</b> Perfil glicêmico obtido no teste de tolerância a glicose dos animais C, CEx, Ob e ObEx após 32 semanas de protocolo experimental.....	44
<b>Figura 9.</b> Área glicêmica, obtida no teste de tolerância à glicose, dos animais controle (C, n=12), controle exercício (CEx, n=14), obeso (Ob, n=10) e obeso exercício (ObEx, n=11) após 32 semanas de protocolo experimental.....	45
<b>Figura 10.</b> Potencial pós-pausa dos animais controle, controle exercício, obeso e obeso exercício submetidos a 32 semanas de protocolo experimental.....	48
<b>Figura 11.</b> Elevação da concentração de cálcio extracelular dos animais controle, controle exercício, obeso e obeso exercício submetidos a 32 semanas de protocolo experimental.....	49
<b>Figura 12.</b> Bloqueio do canal tipo L de cálcio pelo diltiazem dos animais controle, controle exercício, obeso e obeso exercício submetidos a 32 semanas de protocolo experimental.....	50
<b>Figura 13.</b> Vias de sinalização hipertrófica no cardiomiócito em resposta à sobrecarga mecânica.....	59
<b>Figura 14.</b> Vias de sinalização hipertrófica no cardiomiócito em resposta estímulos neuro-humorais.....	60

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Características gerais dos animais controle, controle exercício, obeso e obeso exercício submetidos a 32 semanas de protocolo experimental.....	40
<b>Tabela 2.</b> Características nutricionais dos animais controle, controle exercício, obeso e obeso exercício submetidos a 32 semanas de protocolo experimental.....	42
<b>Tabela 3.</b> Características morfológicas do coração dos animais controle, controle exercício, obeso e obeso exercício submetidos a 32 semanas de protocolo experimental.....	46
<b>Tabela 4.</b> Teor de água nos tecidos cardíaco, pulmonar e hepático dos animais controle, controle exercício, obeso e obeso exercício submetidos a 32 semanas de protocolo experimental.....	47
<b>Tabela 5.</b> Contração isométrica basal dos animais controle, controle exercício, obeso e obeso exercício submetidos a 32 semanas de protocolo experimental.....	48

## SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO .....	17
2 - MATERIAL E MÉTODOS .....	21
2.1 - Animais .....	21
2.2 - Protocolo experimental .....	21
2.2.1 - Indução e exposição à obesidade .....	21
2.2.1.1 - Indução à obesidade .....	22
2.2.1.2 - Exposição à obesidade .....	22
2.2.2 - Composição das dietas.....	22
2.2.3 - Determinação da obesidade, composição e redistribuição dos grupos .....	24
2.2.4 - Protocolo de treinamento físico aeróbio.....	25
2.3 - Avaliação nutricional dos animais .....	27
2.4 - Obesidade e comorbidades .....	28
2.4.1 - Hipertensão arterial sistêmica .....	28
2.4.2 - Intolerância à glicose .....	28
2.5 - Caracterização da remodelação cardíaca .....	29
2.5.1 - Estrutura do coração <i>post mortem</i> .....	29
2.5.2 - Determinação do teor de água nos tecidos cardíaco, pulmonar e hepático .....	29
2.6 - Função miocárdica .....	30
2.6.1 - Avaliação da função miocárdica .....	30
2.6.1.1 - Parâmetros funcionais .....	32
2.6.1.2 - Protocolo funcional .....	33
2.6.1.2.1 - Potenciação pós-pausa .....	34
2.6.1.2.2 - Elevação da concentração de cálcio extracelular .....	34

2.7 - Análise da atividade dos canais de cálcio tipo L sarcolemal .....	34
2.7.1 - Atividade dos Canais de Cálcio Tipo L sarcolemal .....	35
2.8 - Análise estatística .....	36
3 - RESULTADOS .....	37
3.1 - Caracterização do momento inicial da obesidade .....	37
3.2 - Evolução do peso corporal durante o período de exposição à obesidade .....	37
3.3 - Evolução do peso corporal durante o protocolo de treinamento físico .....	38
3.4 - Perfil nutricional .....	39
3.4.1 - Características gerais .....	39
3.4.2 - Características nutricionais .....	41
3.5 - Pressão arterial .....	42
3.6 - Perfil glicêmico .....	43
3.7 - Características morfológicas cardíacas .....	45
3.8 - Determinação do teor de água nos tecidos cardíaco, pulmonar e hepático .....	46
3.9 - Avaliação da função cardíaca <i>in vitro</i> .....	47
3.9.1 - Condição basal .....	47
3.9.2 - Potenciação pós-pausa .....	48
3.9.3 - Elevação da concentração de cálcio extracelular .....	49
3.9.4 - Experimento <i>diltiazem</i> .....	49
4 - DISCUSSÃO .....	51
4.1 - Momento inicial da obesidade .....	51
4.2 - Constituição dos grupos Controle e Obeso .....	52
4.3 - Protocolo de treinamento físico .....	52
4.4 - Perfil nutricional .....	53
4.5 - Comorbidades .....	56

4.6 - Remodelação cardíaca .....	57
4.7 - Função miocárdica .....	61
5 - CONCLUSÃO .....	66
6 - REFERÊNCIAS .....	67



## 1. INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença complexa caracterizada pelo acúmulo excessivo de tecido adiposo<sup>(63)</sup>. A incidência e prevalência da obesidade no mundo têm aumentado progressivamente nas últimas décadas<sup>(81)</sup>, sendo considerada atualmente, uma epidemia global e um importante problema de saúde pública<sup>(31,94,131)</sup>. Mundialmente, em 2014, mais de 1,9 bilhões de adultos apresentavam sobrepeso, sendo que, mais de 30% desta população estava obesa<sup>(132)</sup>.

No Brasil, as mudanças demográficas, sócio-econômicas e epidemiológicas ao longo do tempo permitiram que ocorresse a chamada transição nutricional, com diminuição progressiva da desnutrição e aumento da obesidade<sup>(39,40,87)</sup>. Segundo a Pesquisa de Orçamentos Familiares do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística <sup>(13)</sup>, nas últimas décadas houve aumento contínuo do número de crianças, adolescentes e adultos com sobrepeso e obesidade. Os dados apontam que 49% da população adulta brasileira apresenta sobrepeso e, deste grupo, 14,8 % são obesos.

Estudos que avaliaram as consequências da obesidade para a saúde humana têm mostrado que a sua etiologia é complexa. Enquanto alguns autores sugerem que o fator genético pode contribuir para o desenvolvimento da obesidade, a maioria das pesquisas enfatiza que a prevalência desta doença na população ocorre devido aos chamados fatores ambientais, em especial a dieta e o sedentarismo<sup>(110)</sup>. O aumento do consumo de energia, a redução na prática de atividade física ou a combinação de ambos têm levado a um balanço calórico positivo com consequente aumento da gordura corporal<sup>(114)</sup>. Dentro desse contexto, a obesidade se consolidou como agravo nutricional associado a uma alta incidência de morbidades, como câncer, resistência à insulina, diabetes mellitus tipo 2, dislipidemias e doenças cardiovasculares<sup>(80,101)</sup> influenciando a taxa de mortalidade das populações, e, consequentemente, reduzindo a expectativa de vida<sup>(38,52,98,128)</sup>.

A obesidade experimental, utilizando modelos genéticos ou manipulações dietéticas, tem sido uma alternativa importante para o estudo da obesidade, comorbidades e mecanismos oriundos do excesso de gordura corporal<sup>(19,27,37,102,104)</sup>. Dentro desse contexto, a obesidade por meio de dietas com alta densidade energética representa um modelo mais realista e apropriado para o estudo das causas e consequências da obesidade humana.

Diversos estudos experimentais têm proposto que a obesidade, induzida por diferentes tipos de dietas, com alto teor de gordura e/ou altamente energéticas, acarreta disfunção miocárdica em roedores<sup>(30,66,67,102,103)</sup>. Du Toit *et al.*<sup>(30)</sup> mostraram que a obesidade deprime a função miocárdica em situação basal e após isquemia em ratos submetidos à dieta de cafeteria por 16 semanas. Além disso, outros autores observaram prejuízo funcional em cardiomiócitos isolados de modelos de obesidade induzidos por dietas ricas em gordura<sup>(102,103)</sup>. Pesquisas recentes realizadas em nosso laboratório também mostram que ratos obesos alimentados com dieta rica em gordura durante 15 semanas apresentam disfunção miocárdica em condições basais e após manobras inotrópicas<sup>(66,67)</sup>.

Embora seja evidente que uma variedade de danos no desempenho cardíaco, tanto em humanos quanto em modelos experimentais, ocorre com a elevação da quantidade de tecido adiposo, os mecanismos responsáveis por estas alterações não estão estabelecidos. Pesquisadores sugerem que o prejuízo funcional em modelos de obesidade pode ser decorrente de anormalidades no trânsito de cálcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ) intracelular miocárdico, as quais podem estar associadas principalmente com alterações na expressão ou função de canais e de proteínas envolvidas nesta homeostase<sup>(30,66,73,74,102)</sup>.

O trânsito de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular é um dos principais mecanismos reguladores da contratilidade e relaxamento cardíaco<sup>(9)</sup>. A despolarização da membrana pelo potencial de ação proporciona a abertura dos canais de tipo L (CACNA1C), o que em um plano geral acarreta a contração do coração durante a sístole<sup>(76)</sup>. Estes canais, localizados na membrana

plasmática, são responsáveis pelo influxo de  $\text{Ca}^{+2}$  e, portanto, desempenham papel importante na regulação da força contrátil<sup>(9,105)</sup>.

Alterações na quantidade ou função dos canais de cálcio tipo L têm sido implicadas em uma variedade de doenças cardiovasculares, como fibrilação atrial, insuficiência cardíaca e isquemia crônica<sup>(3,4,90)</sup>. Diversos modelos experimentais mostram que os canais de  $\text{Ca}^{+2}$  tipo L exercem papel fundamental no desempenho cardíaco<sup>(14,24)</sup>. Os autores relatam que o prejuízo na função deste canal pode acarretar disfunção cardíaca. Entretanto, foi encontrado apenas um estudo que avaliou a participação deste canal na deterioração funcional induzida pela obesidade. Estudo recente realizado em nosso laboratório, avaliando o canal de cálcio tipo L sarcolemal de ratos obesos após 15 semanas, demonstrou que a disfunção miocárdica induzida pela obesidade está relacionada com o comprometimento da atividade destes canais sem mudanças na expressão proteica<sup>(66)</sup>.

Pesquisas têm demonstrado que o exercício físico aumenta a função cardíaca, a sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio e a contratilidade dos cardiomiócitos<sup>(76,99,116)</sup>. Sugizaki *et al.*<sup>(116)</sup> mostraram que o exercício físico aumenta a expressão gênica dos canais de  $\text{Ca}^{+2}$  tipo L, indicando um possível aumento do influxo de cálcio e, consequentemente, melhora da resposta contrátil cardíaca; no entanto, não foi avaliada a expressão proteica dos canais de cálcio tipo L. Outro estudo, realizado por Paulino *et al.*<sup>(99)</sup>, verificou que o exercício físico previne a disfunção cardíaca e atenua a redução da expressão proteica da fosfolambam fosforilada na treonina 17 e do receptor de rianodina fosforilado na serina 2808 de ratos obesos submetidos à dieta hiperlipídica, entretanto, este estudo não avaliou os canais de cálcio tipo L.

Em razão da carência de informações e estudos que avaliaram a relação entre disfunção cardíaca, exercício físico e canais de cálcio tipo L em modelos de obesidade, a proposta deste estudo foi analisar a influência do treinamento físico sobre a função dos canais

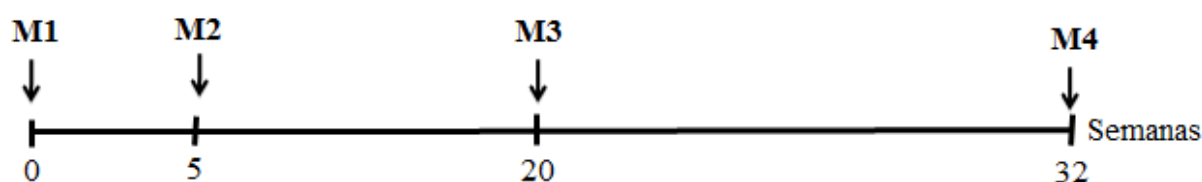
de cálcio tipo L no miocárdio de ratos obesos induzidos por dieta hiperlipídica, por meio de avaliação da atividade funcional. A hipótese deste estudo é que o treinamento físico melhora a função dos canais de cálcio tipo L de ratos obesos induzidos por dieta hiperlipídica.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1- Animais

No presente estudo foram utilizados 80 ratos *Wistar* machos, com 30 dias de idade, mantidos em: gaiolas individuais de polipropileno com tampas de arame cromado forradas com maravalha de *Pinus* esterilizada, temperatura ambiente ( $24 \pm 2^\circ\text{C}$ ), umidade controlada ( $55 \pm 5\%$ ) e ciclos de iluminação de 12 horas. Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com o “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*” publicado pelo “U.S. National Institutes of Health” e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Experimentação Científica (CEUA) da Universidade Federal do Espírito Santo sob protocolo 1036-2013.

### 2.2- Protocolo Experimental



**M1:** Início do protocolo experimental; indução à obesidade.

**M2:** Início da obesidade.

**M3:** Caracterização da obesidade e redistribuição dos grupos para o início do protocolo de treinamento físico.

**M4:** Fim do protocolo experimental; eutanásia e realização das análises do estudo.

**Figura 1.** Representação esquemática do delineamento experimental do trabalho.

#### 2.2.1- Indução e exposição à obesidade

O protocolo de indução e exposição à obesidade perdurou 20 semanas consecutivas, sendo cinco (5) semanas de indução e 15 semanas de exposição à obesidade. Inicialmente, os

ratos foram randomizados em dois grupos: a) controle: alimentados com dieta normocalórica (C, n= 40) e b) obeso: alimentados com dieta hiperlipídica insaturada (Ob, n= 40) (Figura 1).

#### **2.2.1.1- Indução à obesidade**

O momento do início da obesidade foi determinado aferindo-se semanalmente o peso corporal dos animais. Na quinta semana de tratamento, observou-se aumento significativo do peso corporal no grupo Ob em relação ao C. Este momento foi considerado o início da obesidade.

#### **2.2.1.2- Exposição à obesidade**

O período de exposição à obesidade foi iniciado após as 5 semanas de protocolo experimental, período necessário para caracterização do momento inicial da obesidade. Desta forma, o período de exposição à obesidade perdurou por 15 semanas.

#### **2.2.2- Composição das dietas**

As dietas fornecidas apresentavam quantidades suficientes de proteínas, vitaminas e minerais de acordo com as *Exigências de Nutrientes para Animais de Laboratório*<sup>(7)</sup>. Os animais C receberam ração padrão para roedores contendo 12,3% de suas calorias provenientes de gordura, 57,9% de carboidratos, e 29,8% de proteínas (RC Focus 1765, Agrocere<sup>®</sup>, Rio Claro, São Paulo, Brasil). A ração padrão RC Focus 1765 é composta pelos seguintes ingredientes: fosfato bicálcico, óleo de soja degomado, cloreto de sódio, milho moído, aditivo antioxidante, farelo de soja, farelo de trigo, farinha de carne e ossos, farinha de peixe, suplemento mineral e vitamínico.

Os animais Ob receberam um ciclo de quatro rações hiperlipídicas palatáveis contendo 49,2% de suas calorias provenientes de gordura, 28,9% de carboidratos e 21,9% de proteínas

(RC Focus 2413, 2414, 2415 e 2416, Agrocere<sup>®</sup>, Rio Claro, São Paulo, Brasil). As quatro rações hiperlipídicas RC Focus 2413, 2414, 2415 e 2416 apresentam a mesma composição nutricional, com exceção dos aditivos flavorizantes, queijo, bacon, chocolate ou baunilha, respectivamente; as rações são constituídas de cloreto de sódio, caseína, soro de leite em pó, concentrado protéico de soja, milho integral moído, farinha de bolacha, fosfato bicálcico, carbonato de cálcio, óleo de milho, aditivos emulsificante e antioxidante, suplemento mineral e vitamínico. Estes ciclos de dietas foram fornecidos por um período de 15 semanas. As rações hiperlipídicas foram alternadas a cada 24 horas. Os ratos C e Ob receberam 50 g de ração e após 24 horas a quantidade não ingerida foi mensurada. A oferta de água foi *ad libitum*.

A composição de macro e micronutrientes das rações padrão e hiperlipídica, mensurada pela empresa Agrocere<sup>®</sup>, Rio Claro, São Paulo, Brasil, está apresentada no Quadro 1. O perfil de ácidos graxos, avaliados no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas do Departamento de Tecnologia - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil, está apresentado no Quadro 2.

**Quadro 1-** Composição dos macro e micronutrientes das rações (%)

Componentes	Rações	
	Padrão	Hiperlipídica
<b>Proteína</b>	22,0	20,0
<b>Carboidrato</b>	42,7	26,4
<b>Gordura</b>	4,0	20,0
<b>Vitaminas e Minerais</b>	11,3	12,1
<b>Fibras</b>	8,0	9,0
<b>Umidade</b>	12,0	12,5
<b>Calorias (Kcal/g)</b>	2,95	3,65
<b>Calorias da proteína (%)</b>	29,8	21,9
<b>Calorias do carboidrato (%)</b>	57,9	28,9
<b>Calorias da gordura (%)</b>	12,3	49,2

**Quadro 2-** Perfil de ácidos graxos saturados e insaturados das rações (%)

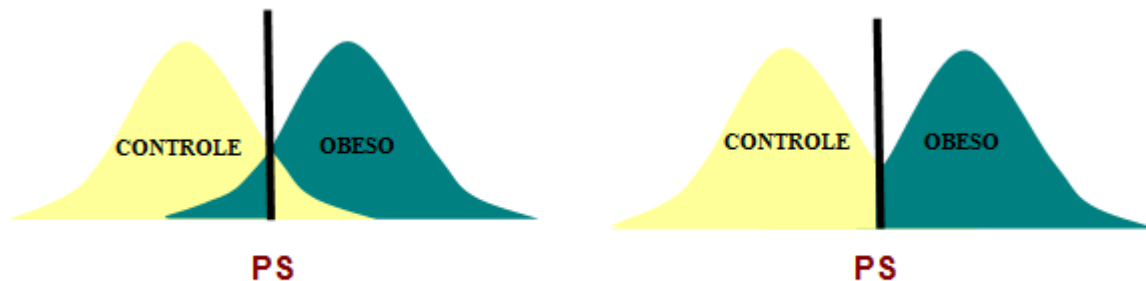
Ácidos graxos	Rações	
	Padrão	Hiperlipídica
Capróico (c6:0)	0,00	0,02
Caprílico (c8:0)	0,03	0,03
Cáprico (c10:0)	0,02	0,05
Láurico (c12:0)	0,33	0,25
Mirístico (c14:0)	0,30	0,33
Palmítico (c16:0)	16,56	15,09
Heptadecanóico (c17:0)	0,02	0,08
Esteárico (c18:0)	3,90	4,36
Palmitoléico (c16:1)	0,06	0,15
Oléico (c18:1n9c)	27,96	37,94
Linoléico (c18:2n6c)	47,10	40,83
$\alpha$ -Linolênico (c18:3n3c)	3,72	0,87
Ácidos Graxos Saturados	21,16	20,21
Ácidos Graxos Insaturados	78,84	79,79

### 2.2.3- Determinação da obesidade, composição e redistribuição dos grupos

Ao final do protocolo de exposição à obesidade, com o intuito de constituir dois grupos homogêneos, assegurando que o grupo C fosse constituído apenas por animais com características de controle e o grupo Ob apenas por animais com características de obeso, foi construído um intervalo de confiança de 95% (IC), baseado nas médias de peso corporal dos ratos C e Ob. Aplicou-se um ponto de separação entre os grupos; um ponto médio entre o limite superior do grupo C e o limite inferior do grupo Ob; a partir deste ponto, foram excluídos do grupo C animais com peso corporal acima do ponto de separação, e do grupo Ob



animais com peso corporal abaixo do ponto de separação, como ilustra a representação esquemática (Figura 2).



**Figura 2.** Representação esquemática do critério utilizado para composição dos grupos controle e obeso antes da redistribuição dos grupos quanto à ausência ou presença do treinamento físico. PS: Ponto de separação.

Desta forma, permaneceram no estudo vinte e seis animais do grupo C (C; n=26) e vinte e um animais do grupo Ob (Ob; n=21).

Após o processo de composição dos grupos, os animais C e Ob foram redistribuídos em mais dois grupos quanto à ausência ou presença do treinamento físico. Sendo assim, na segunda etapa do protocolo experimental, esse estudo foi composto por quatro grupos: controle (C; n=12), controle submetido ao protocolo de treinamento físico (CEX; n=14), obeso (Ob; n=10) e obeso submetido ao protocolo de treinamento físico (ObEx; n=11) (Figura 1).

## 2.2.4- Protocolo de treinamento físico aeróbio

O treinamento físico envolveu um programa de corrida que foi realizado em esteira rolante específica para ratos (Insight Instrumentos – Ribeirão Preto, SP, Brasil), 5 vezes por semana e durante 12 semanas. Dentro deste contexto, os ratos foram submetidos a um período de adaptação à esteira em baixa intensidade com velocidade de 5 m/min nos dois primeiros dias, 10 m/min nos dois dias posteriores e 15 m/min no último dia, na 1ª semana. Posteriormente, os animais realizaram teste de esforço, em esteira, com velocidade inicial de 9 m/min. A cada 3 minutos a velocidade foi aumentada em 3 m/min até o animal atingir a exaustão<sup>(88,109)</sup>. O critério de exaustão adotado na avaliação no ergômetro foi a não

manutenção da corrida na velocidade proposta por 30 segundos. A fim de ajustar as cargas de exercício, o teste de esforço foi repetido a cada duas semanas.

Os animais dos grupos Controle Exercício (CEEx) e Obesidade Exercício (ObEx) foram submetidos a um programa de treinamento físico aeróbico adaptado de Mostarda *et al.*<sup>(89)</sup> com progressão do volume e intensidade apresentados no Quadro 3.

**Quadro 3.** Protocolo de Treinamento Físico

Semanas	Progressão de Treinamento	
	Volume	Intensidade (VMC)
<b>1</b>	15 minutos	55%
<b>2</b>	30 minutos	55%
<b>3</b>	30 minutos	60%
<b>4</b>	45 minutos	60%
<b>5</b>	45 minutos	65%
<b>6</b>	60 minutos	65%
<b>7 a 12</b>	60 minutos	70%

VMC: Velocidade máxima de corrida obtida no teste de esforço.

Na semana 1 a intensidade foi de 55% da velocidade máxima obtida no teste de esforço e o volume foi de 15 minutos por dia, 5 dias na semana. Na semana 2 a intensidade foi a mesma da primeira semana e o volume foi de 30 minutos por dia, 5 dias na semana. Na semana 3 a intensidade foi de 60% da velocidade máxima obtida no teste de esforço e o volume foi o mesmo da segunda semana, 5 dias na semana. Na semana 4 a intensidade foi a mesma da terceira semana e o volume foi de 45 minutos, 5 dias na semana. Na semana 5 a intensidade foi de 65% da velocidade máxima obtida no teste de exaustão e o volume foi o mesmo da quarta semana, 5 dias por semana. Na semana 6 a intensidade foi a mesma da quinta semana e o volume foi de 60 minutos, 5 dias por semana. Na semana 7 a intensidade foi de 70% da velocidade máxima obtida no teste de exaustão e o volume de 60 minutos, 5

dias por semana. A estrutura da semana 7 foi mantida por mais 5 semanas de treinamento, quando se encerrou o protocolo de 12 semanas de treinamento físico.

### **2.3- Avaliação nutricional dos animais**

O perfil nutricional foi determinado pela análise do peso e gordura corporal, índice de adiposidade, lipídios e glicemia sérica. O peso corporal dos animais foi aferido semanalmente, utilizando-se balança digital Mettler® modelo Spider 2 (Toledo do Brasil Indústria de Balanças Ltda, São Bernardo do Campo, São Paulo, Brasil). A quantidade de gordura corporal total foi determinada pela somatória dos depósitos de gordura epididimal, retroperitoneal e visceral. O índice de adiposidade foi calculado, dividindo-se a gordura corporal total pelo peso corporal final, multiplicado por 100<sup>(118)</sup>. O tamanho dos animais foi avaliado a partir do comprimento nasoanal.

Para análise do perfil glicêmico e lipídico, os ratos foram colocados em jejum por 12 a 15 horas, anestesiados com cloridrato de ketamina (50 mg/kg/ip; Dopalen®, Sespo Indústria e Comércio Ltda - Divisão Vetbrands, Jacareí, São Paulo, Brasil) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg/ip; Anasedan®, Sespo Indústria e Comércio Ltda - Divisão Vetbrands, Jacareí, São Paulo, Brasil) e eutanasiados por decapitação. A seguir, as amostras de sangue foram coletadas em tubos *Falcon*, centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos (Eppendorf® Centrifuge 5804-R, Hamburg, Germany) e armazenadas em freezer à -80°C (Thermo Fisher Scientific LLC, Asheville, NC, USA). As concentrações séricas de glicose, triacilglicerol e colesterol total, foram determinadas utilizando-se *kits* específicos (Bioclin Bioquímica®, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil e Synermed do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) e analisadas pelo analisador bioquímico automatizado BS-200 (Mindray do Brasil - Comércio e Distribuição de Equipamentos Médicos Ltda, São Paulo, Brasil).

## **2.4- Obesidade e comorbidades**

As alterações no perfil cardiovascular, metabólico e hormonal, como hipertensão arterial sistêmica, intolerância à glicose, resistência sistêmica à insulina<sup>(19)</sup> que podem estar frequentemente associadas à obesidade, foram avaliadas nos grupos experimentais.

### **2.4.1- Hipertensão arterial sistêmica**

Como os animais obesos podem apresentar hipertensão arterial sistêmica<sup>(28)</sup> foi mensurada a pressão arterial sistólica (PAS). A PAS foi aferida indiretamente por pletismografia de cauda, utilizando-se eletro esfigmomanometro Narco Bio-System<sup>®</sup>, modelo 709-0610 (International Biomedical, Inc, USA); este método não permite avaliar a pressão arterial diastólica. Com a finalidade de produzir vasodilatação da artéria caudal, os ratos foram previamente aquecidos, à temperatura de 40°C por 5 minutos, em uma caixa de madeira (50 x 40 cm) forrada com maravalha de *Pinus* autoclavada. Após o aquecimento, foi acoplado o sensor e o manguito em torno da cauda do animal. O manguito foi insuflado automaticamente até atingir pressão de 200 mmHg e, posteriormente, desinsuflado. As pulsações arteriais foram registradas em polígrafo Gould RS 3200 (Gould Instrumenta Valley View, Ohio, USA).

### **2.4.2- Intolerância à glicose**

Como os animais obesos podem apresentar níveis glicêmicos normais em condições basais, foi analisado o perfil glicêmico após uma sobrecarga de glicose<sup>(1)</sup>. As coletas de sangue, na artéria caudal, foram realizadas na condição basal após um período de jejum de 6 horas e após administração intraperitoneal de glicose 25% (Sigma-Aldrich,<sup>®</sup> St Louis, MO, USA), equivalente a 2 g/kg. As amostras sanguíneas foram coletadas nos momentos 0, considerado condição basal, e após 15, 30, 60, 90 e 120 minutos da infusão da glicose. A

mensuração dos níveis glicêmicos foi realizada com glicosímetro portátil Accu-Chek Go Kit (Roche Diagnostic Brazil Ltda, São Paulo, Brasil). A intolerância à glicose nestes animais foi avaliada pelo perfil da curva e área glicêmica.

## **2.5- Caracterização da remodelação cardíaca**

Como a obesidade pode acarretar remodelação cardíaca<sup>(19,37,66,102)</sup>, a estrutura e a função do coração foram analisadas. A estrutura foi avaliada *post mortem* por meio de análise macroscópica; a função cardíaca *in vitro* foi analisada utilizando-se o músculo papilar isolado. Os métodos utilizados para análise da remodelação cardíaca estão descritos abaixo.

### **2.5.1- Estrutura do coração *post mortem***

A análise estrutural macroscópica *post mortem* permite identificar a presença de remodelação cardíaca a nível atrial e ventricular<sup>(82)</sup>. A remodelação a nível macroscópico, que identifica a presença ou ausência de hipertrofia, foi determinada pela análise dos seguintes parâmetros: peso total do coração, do átrio, dos ventrículos esquerdo e direito, e das respectivas relações com o comprimento da tíbia. A tíbia foi dissecada e seu comprimento mensurado com auxílio de um paquímetro.

### **2.5.2- Determinação do teor de água nos tecidos cardíaco, pulmonar e hepático**

Como os obesos podem desenvolver retenção hídrica, caracterizando sinais de insuficiência cardíaca, a avaliação do teor de água tecidual foi realizada nas amostras de ventrículo esquerdo (VE), ventrículo direito (VD), átrios (AT), pulmão e fígado. Após a remoção do tecido a ser examinado, foi aferido o peso *in natura*. Em seguida, as amostras foram submetidas à secagem em estufa sob temperatura de  $55 \pm 5^{\circ}\text{C}$ , por período de 48 horas.

A determinação do teor de água foi expressa em valores relativos e calculada pela seguinte fórmula:  $[(PN-PS)/PN] \times 100\%$ , onde PN representa o peso *in natura* e o PS o peso seco.

## 2.6- Função miocárdica

### 2.6.1- Avaliação da função miocárdica

A técnica que utiliza o músculo papilar isolado do ventrículo esquerdo, realizada rotineiramente em nosso laboratório<sup>(22,66)</sup>, avalia a função mecânica do miocárdio *in vitro*. Esta preparação permite detectar alterações na contração e no relaxamento do músculo cardíaco, independente das variações da pós-carga, pré-carga, frequência cardíaca, influência hormonal e substrato energético, o que é difícil de ser obtido na avaliação do coração *in vivo*. Além disso, como a adaptação do organismo à obesidade pode causar efeitos indiretos no coração, o estudo com músculo papilar isolado tem a vantagem de possibilitar a análise direta da função miocárdica. O estudo funcional do músculo papilar isolado do ventrículo esquerdo foi realizado conforme técnica descrita abaixo.

Os animais foram anestesiados com cloridrato de ketamina (50 mg/kg/ip; Dopalen<sup>®</sup>, Sespo Indústria e Comércio Ltda - Divisão Vetbrands, Jacareí, São Paulo, Brasil) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg/ip; Anasedan<sup>®</sup>, Sespo Indústria e Comércio Ltda - Divisão Vetbrands, Jacareí, São Paulo, Brasil), eutanasiados por decapitação e submetidos à toracotomia mediana. Os corações foram rapidamente removidos e colocados em solução de Krebs-Henseleit de acordo com a seguinte composição em mM: 118,5 NaCl; 4,69 KCl; 2,5 CaCl<sub>2</sub>; 1,16 MgSO<sub>4</sub>; 1,18 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 5,50 glicose e 24,88 NaHCO<sub>3</sub>, previamente aerados durante 10 minutos com 95% de oxigênio (O<sub>2</sub>) e 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e mantidos à temperatura de 28°C. Após permanecerem aproximadamente 1 minuto na solução, os corações foram retirados e o ventrículo direito dissecado com a finalidade de expor o septo interventricular; este foi

dividido a fim de permitir a exposição adequada dos dois músculos papilares, anterior e posterior, do ventrículo esquerdo. Os músculos papilares foram cuidadosamente dissecados, mantendo-se nas suas extremidades segmentos da parede ventricular. Esses fragmentos foram presos a anéis de aço inoxidável com diâmetro interno de 3,8 a 4,2 mm; a fixação dos anéis nestes fragmentos tem como finalidade evitar a lesão da extremidade dos músculos papilares. Estes, após terem suas extremidades presas aos anéis, foram rapidamente transferidos para um sistema de banho de tecido isolado (PanLab - Harvard Apparatus, Cornella, Barcelona, Espanha) contendo a mesma solução de Krebs-Henseleit descrita acima, continuamente aerada com 95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub> e mantida à temperatura de 28°C, usando-se um termorregulador acoplado ao sistema (PanLab - Harvard Apparatus, Cornella, Barcelona, Espanha). O músculo papilar foi posicionado verticalmente e sua extremidade inferior acoplada a um fio de aço inoxidável, 0,38 mm de diâmetro, conectado a um transdutor de força (MLT0201 Force Transducer, ADInstruments do Brasil, São Paulo, Brasil). O fio de aço atravessa uma fenda, preenchida por mercúrio, existente no assoalho da câmara de vidro. A porção superior tendinosa do músculo papilar foi conectada a um fio de aço, semelhante ao anterior, que está ligado à extremidade do braço longo de uma alavanca isotônica de metal. Sobre esta extremidade existe um micrômetro (L.S. Starrett. Co. Athol. Mass. nº463, USA) que controla a extensão dos movimentos da alavanca, permitindo ajustar o comprimento de repouso do músculo papilar.

Os músculos papilares foram estimulados 12 vezes por minuto (0,2 Hz) por meio de eletrodos de platina tipo agulha, posicionados paralelamente ao eixo longitudinal dos músculos. Os eletrodos foram acoplados a um estimulador elétrico (LE12406 - Estimulador, PanLab - Harvard Apparatus, Cornella, Barcelona, Espanha) que emite estímulos em onda quadrada de 5 mili-segundos. A voltagem de estímulo utilizada foi de 12 a 15 volts, aproximadamente, 10% acima do valor mínimo necessário para provocar resposta mecânica

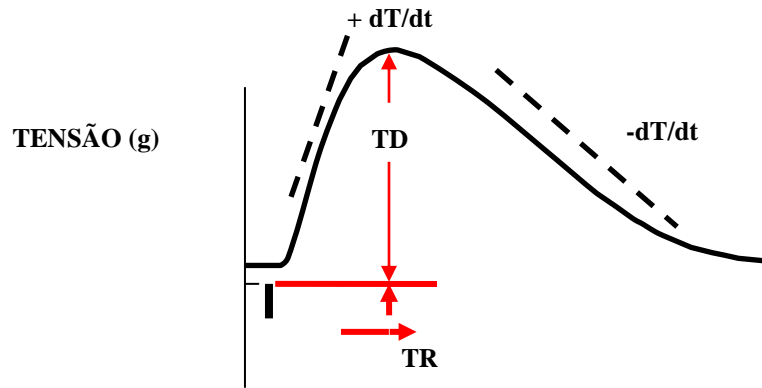
máxima do músculo. O pH da solução foi entre 7,38 a 7,42 e a pressão parcial de oxigênio da solução foi mantida entre 550 a 600 mmHg.

Após um período de 60 minutos, durante os quais os músculos contraíram contra a pré-carga sem desenvolver força, contração isotônica, foi colocado uma carga adicional de 50 g, denominada *pós-carga*, no transdutor de força. A carga total, pré-carga acrescida da pós-carga, impede que os músculos encurtem, passando os mesmos a desenvolverem somente força, contração isométrica. O excessivo estiramento muscular que poderia ser causado pela adição da pós-carga foi evitado pelo micrômetro que impede a movimentação da alavanca. Após a estabilização do músculo em contração isométrica, este foi progressivamente estirado, por meio do micrômetro, até a força desenvolvida atingir o seu valor máximo. O comprimento de estiramento da fibra muscular associado à força ou tensão máxima desenvolvida, em contração isométrica, denomina-se  $L_{max}$ . Após atingir o  $L_{max}$ , o músculo foi novamente colocado em contração isotônica durante 5 minutos. A seguir, o músculo papilar foi recolocado em contração isométrica para determinação final de  $L_{max}$ . O registro das variáveis foi iniciado após verificar que o músculo permanece estável em contração isométrica durante 15 minutos.

#### **2.6.1.1- Parâmetros funcionais**

Os seguintes parâmetros mecânicos foram analisados de uma curva obtida em contração isométrica: tensão máxima desenvolvida (TD,  $\text{g/mm}^2$ ), tensão de repouso (TR,  $\text{g/mm}^2$ ), velocidade máxima de variação da tensão desenvolvida ( $+dT/dt$ ,  $\text{g/mm}^2/\text{s}$ ) e velocidade máxima de variação de decréscimo da tensão desenvolvida ( $-dT/dt$ ,  $\text{g/mm}^2/\text{s}$ ). A curva de contração isométrica que foi obtida durante os experimentos está representada abaixo, na Figura 3.





**Figura 3.** Representação esquemática da curva de contração isométrica.

As contrações isométricas foram registradas em um sistema de aquisição de dados computadorizado (Biopac, ADInstruments do Brasil, São Paulo, Brasil). A análise das curvas permite determinar os valores dos parâmetros mecânicos. Os valores da TD, TR,  $+dT/dt$  e  $-dT/dt$  foram divididos pela área seccional do músculo papilar. Este processo de normalização permite comparar o desempenho de músculos de diferentes tamanhos. Os dados obtidos foram apresentados em valores absolutos ( $\text{g}/\text{mm}^2$ ).

### 2.6.1.2- Protocolo funcional

Para determinar os mecanismos pelos quais a obesidade promove efeitos inotrópicos negativos e, conseqüentemente, disfunção miocárdica, os músculos papilares, em contração isométrica, foram avaliados sob condição basal (concentração de  $\text{Ca}^{+2} = 2,5 \text{ mM}$ ) e após diferentes manobras inotrópicas e lusitrópicas. Essas intervenções têm a finalidade de identificar alterações da contração e do relaxamento que podem não ser observadas em condições basais. As seguintes manobras inotrópicas e lusitrópicas miocárdicas com efeitos positivos foram realizadas:

#### **2.6.1.2.1- Potenciação pós-pausa**

A potenciação pós-pausa (PPP) é um instrumento utilizado para estudar a função de liberação e armazenamento de cálcio pelo retículo sarcoplasmático. Esta manobra permite analisar o relaxamento miocárdico. A relação entre PPP e a função miocárdica foi realizada com concentração de cálcio de 0,5 mM na solução de Krebs-Henseleit e após períodos de repouso de 10, 30, 60 e 90 segundos com intervalos de 5 minutos entre cada elevação.

#### **2.6.1.2.2- Elevação da concentração de cálcio extracelular**

A elevação da concentração de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular acarreta aumento do influxo desse íon por meio dos canais lentos de  $\text{Ca}^{+2}$  e pela troca  $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{+2}$ , o que permite, também como o PPP, avaliar os mecanismos relacionados com o transporte de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular e a função miocárdica. Portanto, essa intervenção possibilita verificar se os músculos papilares de ambos os grupos apresentam ou não disfunção miocárdica. A elevação da concentração de  $\text{Ca}^{+2}$  na solução de Krebs-Henseleit foi realizada com aumentos sequenciais de  $\text{Ca}^{+2}$  de 0,5 para 1,0, 1,5, 2,0 e 2,5 mM com intervalos de 5 minutos entre cada concentração.

### **2.7- Análise da atividade dos canais de cálcio tipo L sarcolemal**

A atividade dos canais de cálcio tipo L foi avaliada por meio da análise funcional (inibição da atividade por meio de bloqueador específico), conforme técnica descrita abaixo.

#### **2.7.1- Atividade dos Canais de Cálcio Tipo L sarcolemal**

Após o protocolo para avaliar a função cardíaca, os músculos papilares de ambos os grupos foram submetidos à análise da atividade do canal de cálcio tipo L, utilizando um inibidor específico denominado diltiazem. O diltiazem (Diltiazem Hydrochloride, Sigma<sup>®</sup>-Aldrich, St Louis, MO, USA) é um bloqueador específico dos canais lentos sarcolemais da

classe das benzotiazepinas<sup>(51,135)</sup>. Os canais tipo L no coração contêm subunidades  $\alpha 1c$  que são altamente sensíveis ao diltiazem, o que resulta em diminuição da entrada de cálcio. Neste experimento, os músculos foram avaliados a partir de elevação sequencial de  $Ca^{+2}$  de 0,5 para 1,0, 1,5, 2,0 e 2,5 mM com ausência ou presença do bloqueador. A dose de diltiazem diluída em água ultrapura e o tempo de exposição ao bloqueador para a realização do experimento foram, respectivamente,  $10^{-4}$  mM e 60 minutos. Os dados obtidos foram expressos em porcentagem média de bloqueio.

Após o término das manobras de avaliação mecânica do músculo papilar, os mesmos foram retirados da preparação e usados para a avaliação da área seccional. Os parâmetros morfológicos utilizados para caracterizar os músculos papilares foram: comprimento (mm), peso (mg) e área seccional ( $mm^2$ ). O comprimento in vitro, ( $L_{m\acute{a}x}$ ) foi medido com auxílio de um catetômetro Gartner (Gartner Scientific Corporation, Chicago, USA). A porção muscular entre os anéis de aço foi cortada, submetida à secagem com papel filtro e pesada. Considerando-se que o músculo papilar tem forma cilíndrica, uniforme e peso específico aproximadamente unitário, a área seccional foi calculada dividindo-se o peso pelo comprimento determinado em  $L_{m\acute{a}x}$ .

Os músculos papilares dissecados, que apresentaram área seccional entre 0,5 e 1,7  $mm^2$ , foram utilizados no experimento, sendo excluídos aqueles que apresentaram área seccional maior que o valor superior ou menor que o valor inferior. Além disso, os músculos papilares que apresentaram comportamento funcional fora do padrão de normalidade foram excluídos do estudo. O desempenho mecânico foi considerado inadequado quando os valores das variáveis obtidas em contração isométrica apresentaram afastamento superior a dois desvios padrão da média, ou seja, cujo escore em valor absoluto foi superior a 1,96.

## 2.8- Análise Estatística

As características gerais, as comorbidades, as análises macro, funcionais em situação basal e após manobras inotrópicas dos grupos experimentais estão expressas por meio de medidas descritivas de posição e variabilidade e submetidas à análise de variância (ANOVA) para amostras independentes (uma via ou duas vias), quando apropriado.

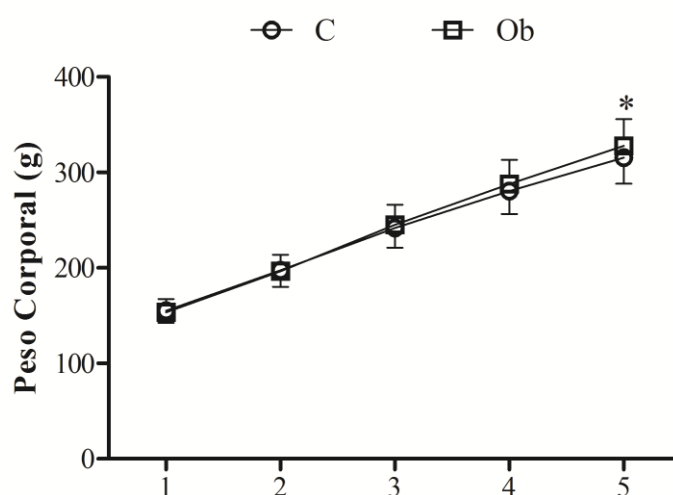
As variáveis relacionadas ao estudo funcional do músculo papilar após a realização das diferentes manobras inotrópicas e lusitrópicas foram estudadas pela ANOVA no modelo de medidas repetidas para esquema de dois fatores independentes e complementada com o teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

A comparação das variações percentuais nos grupos após a ação do inibidor específico dos canais de cálcio tipo L foi realizada pela ANOVA no modelo de medidas repetidas para esquema de dois fatores independentes e complementada com o teste de comparações múltiplas de Bonferroni. O nível de significância considerado para todas as variáveis foi de 5%.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1- Caracterização do momento inicial da obesidade

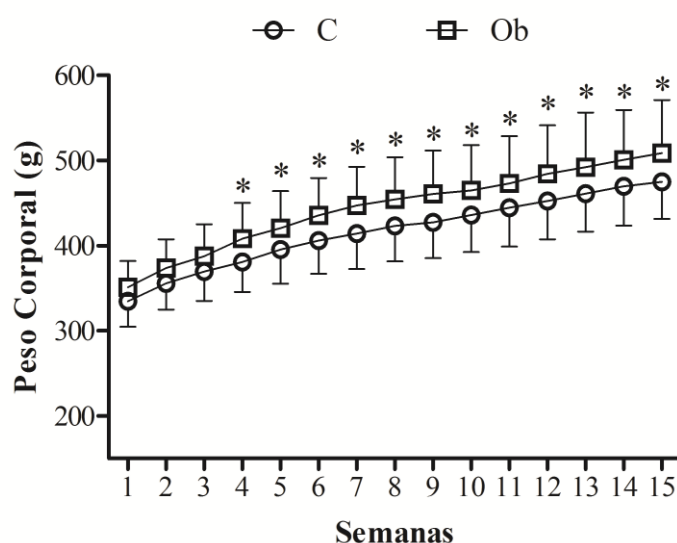
O peso corporal dos animais foi semelhante nas quatro primeiras semanas de protocolo experimental; entretanto, após a 5ª semana, o peso corporal dos animais Ob foi significativamente maior que os C (Figura 4), caracterizando o momento inicial da obesidade.



**Figura 4.** Evolução do peso corporal durante o período de indução à obesidade de 5 semanas. Grupos controle (C, n=40) e obeso (Ob, n=40). Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. \* $p < 0,05$  - C vs. Ob. ANOVA duas vias para medidas repetidas, complementada com o teste *post-hoc* de Bonferroni.

#### 3.2- Evolução do peso corporal durante o período de exposição à obesidade

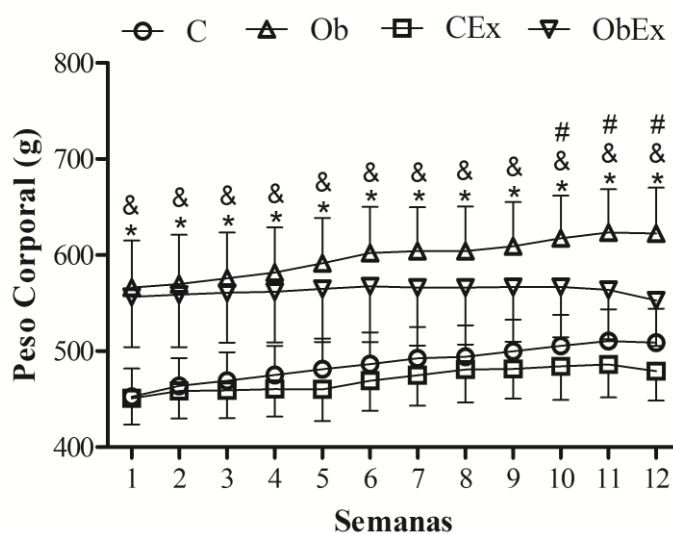
A Figura 5 apresenta a evolução do peso corporal durante o período de exposição à obesidade (15 semanas); nas três semanas iniciais após a caracterização da obesidade não houve diferença entre os grupos para peso corporal, porém, nas 12 semanas consecutivas foi observada diferença significativa entre os grupos.



**Figura 5.** Evolução do peso corporal durante o período de exposição à obesidade de 15 semanas. Grupos controle (C, n=40) e obeso (Ob, n=40). Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. \* $p < 0,05$  - C vs. Ob. ANOVA duas vias para medidas repetidas, complementada com o teste *post-hoc* de Bonferroni.

### 3.3- Evolução do peso corporal durante o protocolo de treinamento físico

Após o critério de exclusão por meio do ponto de separação e redistribuição dos grupos quanto a ausência ou presença de treinamento físico, os animais ObEx e CEx foram submetidos ao protocolo de treinamento físico por um período de 12 semanas. A evolução do peso corporal durante este período está ilustrada na Figura 6. O peso corporal referente aos grupos Ob e ObEx apresentou valores significativamente maiores que dos grupos C e CEx, respectivamente, durante todo o protocolo de treinamento físico. A Figura 3 mostra que o treinamento físico foi eficiente por atenuar o processo de ganho de peso corporal dos animais do grupo ObEx, ao passo que, quando comparados os grupos Ob vs ObEx, o valor de peso do corporal do grupo Ob foi significativamente maior nas semanas 10, 11 e 12. Não houve diferença significativa em nenhum dos momentos entre os grupos C e CEx.



**Figura 6.** Evolução do peso corporal durante o protocolo de treinamento físico por 12 semanas. Controle (C; n=12); controle submetido ao protocolo de treinamento físico (CEx; n=14); obeso (Ob; n=10) e obeso submetido ao protocolo de treinamento físico (ObEx; n=11). Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. \* $p < 0,05$  - C vs. Ob; # $p < 0,05$  - Ob vs ObEx; & $p < 0,05$  - CEx vs ObEx. ANOVA duas vias para medidas repetidas, complementada com o teste *post-hoc* de Bonferroni.

### 3.4- Perfil nutricional

#### 3.4.1- Características gerais

As características gerais após o término do protocolo experimental estão expressas na Tabela 1. O peso corporal final do grupo Ob foi significativamente maior que o grupo C; o mesmo resultado foi visualizado quando comparados os grupos ObEx vs CEx, e Ob vs ObEx. Embora não houve diferença estatística entre os grupos C vs CEx, o grupo CEx apresentou valores menores para o peso corporal final ( $p = 0,068$ ) (Tabela 1).

O ganho de peso corporal durante todo o protocolo experimental foi significativamente maior no grupo Ob quando comparado aos grupos C e ObEx. O mesmo resultado foi observado no grupo ObEx em relação ao grupo CEx. Não houve diferença estatística para o ganho de peso corporal durante todo o protocolo de treinamento físico entre

os grupos C vs CEx. O comprimento nasoanal dos animais obesos (Ob e ObEx) foi significativamente maior que dos seus respectivos controles (C e CEx).

Os depósitos de gordura epididimal e retroperitoneal apresentaram diferença significativa em todas as comparações (C vs Ob; C vs CEx; CEx vs ObEx; Ob vs ObEx), sendo que os obesos apresentaram valores maiores. Na análise dos depósitos de gordura visceral foi identificada diferença significativa nas seguintes comparações: C vs Ob, C vs CEx e Ob vs ObEx, sendo que os obesos apresentaram os maiores valores. Não houve diferença estatística para o depósito de gordura visceral entre os grupos ObEx vs CEx. Os valores de gordura corporal total e índice de adiposidade foram significativamente maiores no grupo Ob quando comparado aos grupos C e ObEx; o mesmo resultado foi visualizado entre os grupos C vs CEx. Embora não houve diferença estatística entre os grupos ObEx vs CEx, o grupo CEx apresentou valores menores para gordura corporal total ( $p = 0,052$ ).

**Tabela 1** - Características gerais dos grupos experimentais.

Variáveis	Grupos			
	C (n=12)	Ob (n=10)	CEx (n=14)	ObEx (n=11)
<b>PCI (g)</b>	157 ± 13	159 ± 7	152 ± 10	160 ± 11
<b>PCF (g)</b>	509 ± 35	622 ± 48*	479 ± 31	553 ± 47 <sup>#&amp;</sup>
<b>Ganho de peso corporal (g)</b>	352 ± 32	463 ± 51*	327 ± 28	393 ± 43 <sup>#&amp;</sup>
<b>Comprimento nasoanal (cm)</b>	27,6 ± 0,7	28,7 ± 0,7*	27,6 ± 0,5	28,4 ± 0,7 <sup>&amp;</sup>
<b>Epididimal (g)</b>	10,2 ± 3,8	14,6 ± 3,2*	5,84 ± 1,60 <sup>§</sup>	8,72 ± 3,68 <sup>#&amp;</sup>
<b>Retroperitoneal (g)</b>	15,6 ± 4,1	31,0 ± 5,8*	10,6 ± 4,4 <sup>§</sup>	14,9 ± 6,5 <sup>#&amp;</sup>
<b>Visceral (g)</b>	6,91 ± 1,74	12,0 ± 3,1*	5,13 ± 1,49 <sup>§</sup>	5,78 ± 2,41 <sup>#</sup>
<b>Gordura corporal total (g)</b>	32,6 ± 9,3	57,6 ± 10,6*	21,5 ± 7,1 <sup>§</sup>	29,4 ± 12,0 <sup>#</sup>
<b>Índice de adiposidade (%)</b>	6,35 ± 1,52	9,19 ± 1,10*	4,46 ± 1,33 <sup>§</sup>	5,30 ± 1,96 <sup>#</sup>

Valores expressos em média ± desvio padrão, n= número total de animais. C: Controle; CEx: controle submetido ao protocolo de treinamento físico; Ob: obeso; ObEx: obeso submetido ao protocolo de treinamento físico. PCI: Peso corporal inicial; PCF: Peso corporal final; Ganho de peso corporal: ganho de peso corporal durante as 32 semanas de protocolo experimental. \* $p < 0,05$  - C vs. Ob; <sup>§</sup> $p < 0,05$  - C vs. CEx ; <sup>&</sup> $p < 0,05$  - CEx vs. ObEx; <sup>#</sup> $p < 0,05$  - Ob vs. ObEx; Anova duas vias para amostras independentes, complementada com o teste *post-hoc* de Bonferroni.



### 3.4.2- Características nutricionais

A Tabela 2 mostra as características nutricionais dos grupos experimentais. Não houve diferença significativa nos valores de ingestão alimentar no período de 15 semanas de exposição à obesidade e após 12 semanas de protocolo de exercício em todas as comparações. A ingestão calórica foi significativamente maior nos grupos Ob e ObEx em relação aos grupos C e CEx, no período de 15 semanas de exposição à obesidade e após 12 semanas de protocolo de treinamento físico, respectivamente. Além disso, durante o período de treinamento físico a ingestão calórica foi maior no grupo Ob quando comparado à do grupo ObEx. Não houve diferença estatística para ingestão calórica entre os grupos C vs CEx no período de exposição à obesidade e treinamento físico.

Os dados de eficiência alimentar no período de 12 semanas de treinamento físico demonstraram diferença significativa para as seguintes comparações: C vs CEx, CEx vs ObEx e Ob vs ObEx, sendo que os valores dos grupos C, CEx e Ob foram maiores, respectivamente. A eficiência alimentar referente a todo o protocolo experimental, 32 semanas, demonstrou valores significativamente maiores nos grupo C e Ob em relação aos grupos CEx e ObEx, respectivamente. Não houve diferença estatística para eficiência alimentar após 32 semanas de protocolo experimental entre os grupos C vs Ob e CEx vs ObEx.

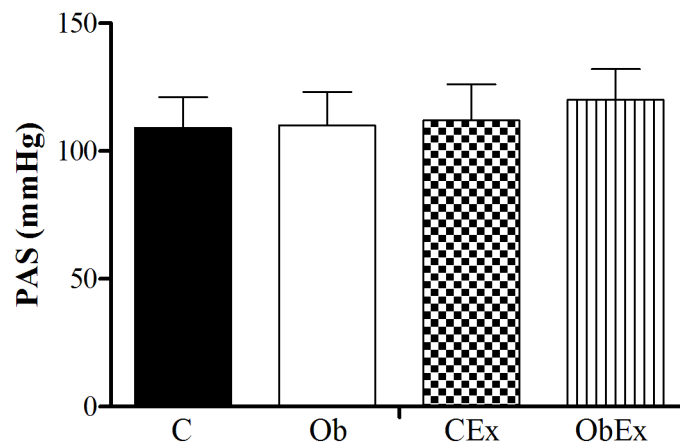
**Tabela 2** - Características nutricionais dos grupos experimentais.

Variáveis	Grupos			
	C (n=12)	Ob (n=10)	CEx (n=14)	ObEx (n=11)
<b>Ingestão Alimentar<sup>1</sup> (g/dia)</b>	22,1 ± 1,7	23,7 ± 2,0	22,6 ± 1,4	23,4 ± 2,0
<b>Ingestão Alimentar<sup>2</sup> (g/dia)</b>	22,7 ± 1,7	24,4 ± 1,7	22,8 ± 2,0	22,8 ± 2,2
<b>Ingestão Calórica<sup>1</sup> (g x Kcal/dia)</b>	65,4 ± 4,9	86,6 ± 7,0*	66,7 ± 4,1	85,6 ± 7,5 <sup>&amp;</sup>
<b>Ingestão Calórica<sup>2</sup> (g x Kcal/dia)</b>	66,8 ± 4,9	88,9 ± 6,2*	67,2 ± 5,9	83,2 ± 8,0 <sup>&amp;#</sup>
<b>Eficiência Alimentar<sup>1</sup> (g/Kcal)</b>	1,77 ± 0,31	2,00 ± 0,76	1,93 ± 0,37	1,98 ± 0,34
<b>Eficiência Alimentar<sup>2</sup> (g/Kcal)</b>	1,00 ± 0,29	0,76 ± 0,11	0,49 ± 0,35 <sup>§</sup>	-0,10 ± 0,43 <sup>#&amp;\$</sup>
<b>Eficiência Alimentar<sup>3</sup> (g/Kcal)</b>	2,38 ± 0,16	2,41 ± 0,18	2,20 ± 0,11 <sup>§</sup>	2,11 ± 0,13 <sup>#</sup>

Valores expressos em média ± desvio padrão, n= número total de animais. <sup>§</sup>Valores expressos em mediana ± semi-amplitude. Protocolo Experimental: 15 semanas de obesidade e 12 semanas de treinamento físico. C: Controle; CEx: controle submetido ao protocolo de treinamento físico; Ob: obeso; ObEx: obeso submetido ao protocolo de treinamento físico. Ingestão Alimentar<sup>1</sup>, Ingestão Calórica<sup>1</sup> e Eficiência Alimentar<sup>1</sup>: Referente ao período de 15 semanas de exposição à obesidade; Ingestão Alimentar<sup>2</sup>, Ingestão Calórica<sup>2</sup> e Eficiência Alimentar<sup>2</sup>: Após o período de 12 semanas de Treinamento Físico. Eficiência Alimentar<sup>3</sup>: Referente à Eficiência Alimentar durante todo o protocolo experimental. \*p<0,05 - C vs. Ob; <sup>§</sup>p<0,05 - C vs. CEx; <sup>&</sup>p<0,05 - CEx vs. ObEx; <sup>#</sup>p<0,05 - Ob vs. ObEx; Anova duas vias para amostras independentes, complementada com o teste *post-hoc* de Bonferroni.

### 3.5- Pressão Arterial

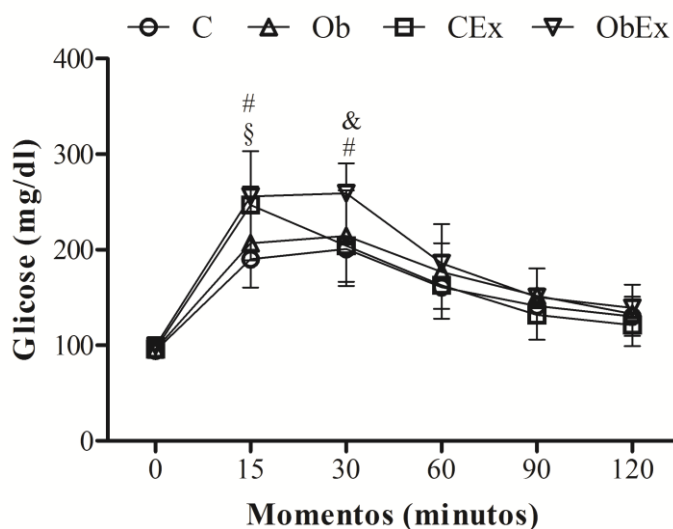
A Figura 7 mostra os resultados de pressão arterial sistólica após 32 semanas de protocolo experimental. Não houve diferença significativa entre os grupos.



**Figura 7.** Valores pressóricos expressos em média  $\pm$  desvio padrão, n= número total de animais. PAS: Pressão Arterial Sistólica. Controle (C; n= 12); controle submetido ao protocolo de treinamento físico (CEx; n= 14), obeso (Ob; n=10) e obeso submetido ao protocolo de treinamento físico (ObEx; n=11). Anova duas vias para amostras independentes, complementada com o teste *post-hoc* de Bonferroni.

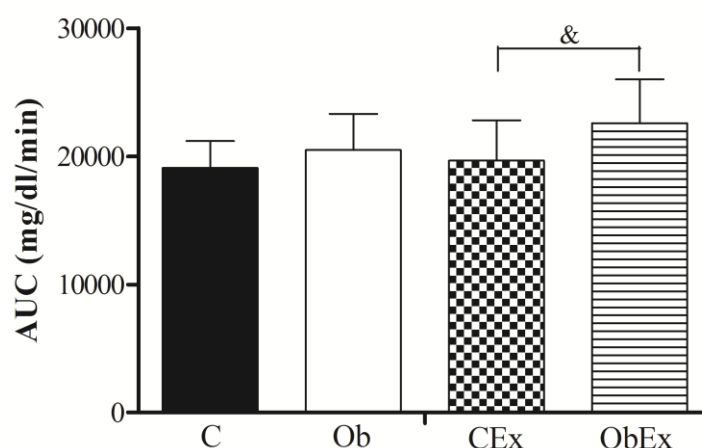
### 3.6- Perfil glicêmico

A Figura 8 mostra o resultado do teste de tolerância à glicose (TTG). Não houve diferença significativa na comparação entre os grupos nos momentos basal, 60', 90' e 120'; no entanto, no momento 15' houve diferença significativa entre os seguintes grupos: C vs CEx e Ob vs ObEx, sendo os maiores valores glicêmicos encontrados nos grupos submetidos ao treinamento físico. Além disso, o grupo ObEx apresentou glicemia elevada no momento 30' quando comparado ao grupo Ob e CEx.



**Figura 8.** Perfil glicêmico obtido no teste de tolerância a glicose dos animais controle (C; n=12), controle submetido ao protocolo de treinamento físico (CEx; n=14), obeso (Ob; n=10) e obeso submetido ao protocolo de treinamento físico (ObEx; n=11) após o protocolo experimental. Valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão, n= número total de animais. §p<0,05 - C vs. CEx; &p<0,05 - CEx vs ObEx; # p<0,05 - Ob vs ObEx; Anova duas vias para amostras independentes, complementada com o teste *post-hoc* de Bonferroni.

A Figura 9 ilustra os resultados da área glicêmica obtida a partir do teste de tolerância a glicose (TTG). Os dados apresentaram diferença significativa entre os grupos CEx vs ObEx, sendo que o maior valor identificado foi do ObEx. Não houve diferença estatística para área glicêmica entre os grupos C vs Ob, C vs CEx e Ob vs ObEx.



**Figura 9.** Área sob a curva para glicose (AUC). Valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão, n= número total de animais. Controle (C; n=12), controle submetido ao protocolo de treinamento físico (CEx; n=14), obeso (Ob; n=10) e obeso submetido ao protocolo de treinamento físico (ObEx; n=11). AUC: Área sob a curva para glicose.  $^{\&}p<0,05$  - CEx vs ObEx. Anova duas vias para amostras independentes, complementada com o teste *post-hoc* de Bonferroni.

### 3.7- Características morfológicas cardíacas

A Tabela 3 apresenta as características morfológicas cardíacas e o comprimento da tíbia após o protocolo experimental. Os valores da tíbia foram maiores nos grupos Ob e ObEx quando comparados aos grupos C e CEx, respectivamente. A comparação entre os grupos CEx vs ObEx apresentou diferença significativa para todas as variáveis (coração, VE, VD, AT, Coração/Tíbia, VE/Tíbia, VD/Tíbia, AT/Tíbia), sendo que os maiores valores encontrados foram referentes ao grupo ObEx. Os animais Ob demonstraram diferença significativa em relação ao C nas seguintes variáveis: coração, tíbia, VD, coração/Tíbia, VD/Tíbia. Além disso, os valores do VE e AT foram maiores no grupo Ob, respectivamente, no entanto, não houve diferença estatística ( $p=0,062$ ) e ( $p=0,055$ ).

**Tabela 3** - Características morfológicas cardíacas após 32 semanas de protocolo experimental.

Variáveis	Grupos			
	C(n=12)	Ob(n=10)	CEx(n=14)	ObEx(n=11)
<b>Tíbia (cm)</b>	4,38 ± 0,10	4,48 ± 0,15*	4,33 ± 0,11	4,46 ± 0,07 <sup>&amp;</sup>
<b>Coração (g)</b>	1,17 ± 0,08	1,33 ± 0,12*	1,22 ± 0,10	1,41 ± 0,23 <sup>&amp;</sup>
<b>VE (g)</b>	0,85 ± 0,05	0,96 ± 0,09	0,89 ± 0,07	1,03 ± 0,20 <sup>&amp;</sup>
<b>VD (g)</b>	0,22 ± 0,04	0,26 ± 0,03*	0,22 ± 0,02	0,27 ± 0,03 <sup>&amp;</sup>
<b>AT (g)</b>	0,098 ± 0,015	0,111 ± 0,015	0,101 ± 0,013	0,117 ± 0,017 <sup>&amp;</sup>
<b>Coração/Tíbia (g/cm)</b>	0,267 ± 0,019	0,298 ± 0,020*	0,281 ± 0,024	0,317 ± 0,048 <sup>&amp;</sup>
<b>VE/Tíbia (g/cm)</b>	0,195 ± 0,013	0,215 ± 0,017	0,206 ± 0,018	0,231 ± 0,049 <sup>&amp;</sup>
<b>VD/Tíbia (g/cm)</b>	0,049 ± 0,010	0,059 ± 0,005*	0,051 ± 0,005	0,059 ± 0,006 <sup>&amp;</sup>
<b>AT/Tíbia (g/cm)</b>	0,022 ± 0,003	0,025 ± 0,003	0,023 ± 0,003	0,026 ± 0,004 <sup>&amp;</sup>

Valores expressos em média ± desvio padrão, n= número total de animais. Protocolo Experimental: 15 semanas de obesidade e 12 semanas de treinamento físico Controle (C); controle submetido ao protocolo de treinamento físico (CEx), obeso (Ob) e obeso submetido ao protocolo de treinamento físico (ObEx). VE: Ventrículo esquerdo; VD: Ventrículo direito; AT: Átrios; VE/Tíbia: Peso do VE corrigido pelo comprimento da Tíbia; VD/Tíbia: Peso do VD corrigido pelo comprimento da Tíbia; AT/Tíbia: Peso do Átrio corrigido pelo comprimento da Tíbia. \*p<0,05 - C vs Ob; <sup>&</sup>p<0,05 - CEx vs ObEx; Anova duas vias para amostras independentes, complementada com o teste *post-hoc* de Bonferroni.

### 3.8- Determinação do teor de água nos tecidos cardíaco, pulmonar e hepático

A Tabela 4 mostra o teor de água dos tecidos cardíaco, hepático e pulmonar. O percentual de umidade do fígado entre os grupos C e Ob apresentou diferença significativa, sendo menor no grupo Ob. Não houve diferença estatística entre os grupos para as demais variáveis VE, VD, AT e pulmão.

**Tabela 4** - Teor de água dos tecidos cardíaco, hepático e pulmonar.

Variável	Grupos			
	C (n=12)	Ob (n=10)	CEx (n=14)	ObEx (n=11)
<b>VE</b>	76,3 ± 3,3	75,5 ± 2,6	76,5 ± 2,6	75,0 ± 4,0
<b>VD</b>	74,1 ± 6,4	76,6 ± 2,3	73,5 ± 9,4	76,5 ± 0,9
<b>AT</b>	78,2 ± 2,0	78,3 ± 1,3	78,4 ± 0,9	78,5 ± 1,4
<b>Pulmão</b>	78,2 ± 1,3	79,1 ± 2,8	79,3 ± 1,8	77,9 ± 1,8
<b>Fígado</b>	67,3 ± 2,3	64,7 ± 1,6*	66,8 ± 1,8	66,0 ± 1,8

Valores expressos em média ± desvio padrão, n= número total de animais. C: Controle; CEx: Grupo Controle submetido a 12 semanas de treinamento físico; Ob: Obeso; ObEx: Grupo Obeso submetido a 12 semanas de treinamento físico. VE: Ventrículo esquerdo; VD: Ventrículo direito; AT: Átrio. \*C vs Ob – p=0,001. Anova duas vias, complementada com o teste *post-hoc* de Bonferroni.

### 3.9- Avaliação da função cardíaca *in vitro*

A avaliação da função cardíaca *in vitro* dos animais, C, CEx, Ob e ObEx, por meio de músculo papilar isolado do VE, está apresentada na Tabela 5 e Figuras 10, 11 e 12. De acordo com o critério estabelecido no item 2.7.1, permaneceram no estudo quarenta e cinco animais (C; n=12; CEx; n=13; Ob; n=10 e ObEx; n=10).

#### 3.9.1- Condição Basal

A obesidade e/ou o protocolo de treinamento físico não foram capazes de modificar as variáveis TD, TR +dT/dt e -dT/dt a partir da análise do estudo funcional do músculo papilar isolado, desde que não houve diferença significativa entre os grupos na condição basal (Tabela 5).

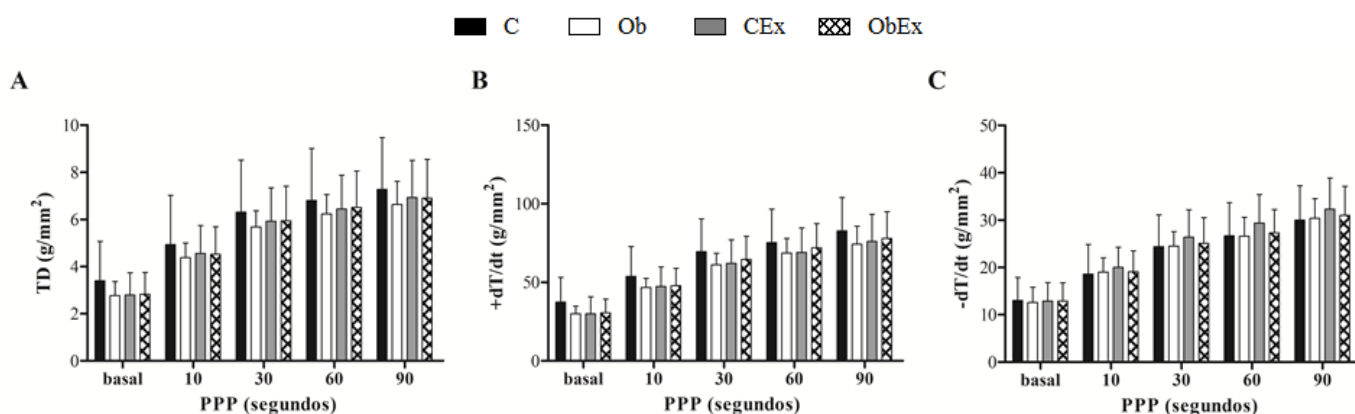
**Tabela 5** - Contração isométrica basal.

Variáveis	Grupos			
	C(n=12)	Ob(n=10)	CEx(n=13)	ObEx(n=10)
<b>TD (g/mm<sup>2</sup>)</b>	7,51 ± 0,52	6,91 ± 0,57	6,76 ± 0,48	6,39 ± 0,54
<b>TR (g/mm<sup>2</sup>)</b>	0,98 ± 0,11	0,73 ± 0,13	0,77 ± 0,11	0,90 ± 0,12
<b>+dT/dt (g/mm<sup>2</sup>/s)</b>	85,9 ± 22,8	79,3 ± 12,5	77,7 ± 16,2	76,4 ± 17,6
<b>-dT/dt (g/mm<sup>2</sup>/s)</b>	27,7 ± 6,4	26,8 ± 4,2	27,1 ± 6,0	24,7 ± 4,9
<b>Área Seccional (mm<sup>2</sup>)</b>	1,02 ± 0,09	1,21 ± 1,00	1,11 ± 0,09	1,25 ± 1,00

Dados expressos em média ± desvio-padrão. C: Controle; CEx: controle submetido ao protocolo de treinamento físico; Ob: obeso; ObEx: obeso submetido ao protocolo de treinamento físico. TD: tensão máxima desenvolvida; TR: tensão de repouso; +dT/dt: velocidade máxima de variação da tensão desenvolvida; -dT/dt: velocidade máxima de variação de decréscimo da tensão desenvolvida. Análise de variância (ANOVA) duas vias.

### 3.9.2- Potenciação pós-pausa

Os efeitos da potenciação pós-pausa na função do músculo papilar em valores absolutos (g/mm<sup>2</sup>) estão ilustrados na Figura 10. Não foram identificadas diferenças significativas para os parâmetros funcionais entre os quatro grupos experimentais.

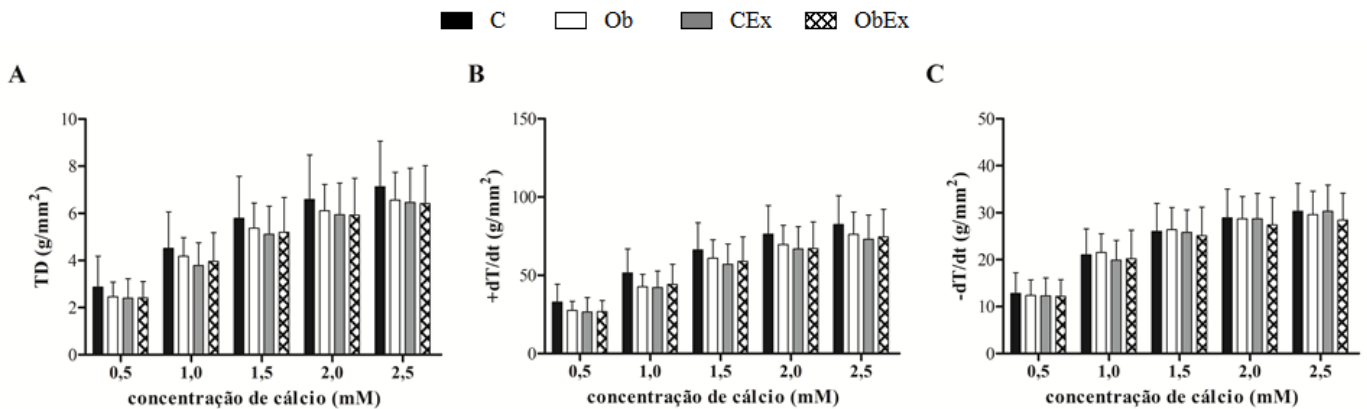


**Figura 10.** Potencial pós-pausa (PPP). Dados expressos em média ± desvio-padrão. C: Controle; CEx: controle submetido ao protocolo de treinamento físico; Ob: obeso; ObEx: obeso submetido ao protocolo de treinamento físico. A: TD - tensão máxima desenvolvida; B: +dT/dt - velocidade máxima de variação da tensão desenvolvida; C: -dT/dt - velocidade máxima de variação de decréscimo da tensão desenvolvida. Análise de variância (ANOVA) duas vias para o modelo de medidas repetidas para grupos independentes.



### 3.9.3- Elevação da concentração de cálcio extracelular

Os efeitos da elevação da concentração de cálcio extracelular na função do músculo papilar em valores absolutos ( $\text{g}/\text{mm}^2$ ) estão demonstrados Figura 11. Não foram identificadas diferenças significativas para os parâmetros funcionais entre os quatro grupos experimentais.

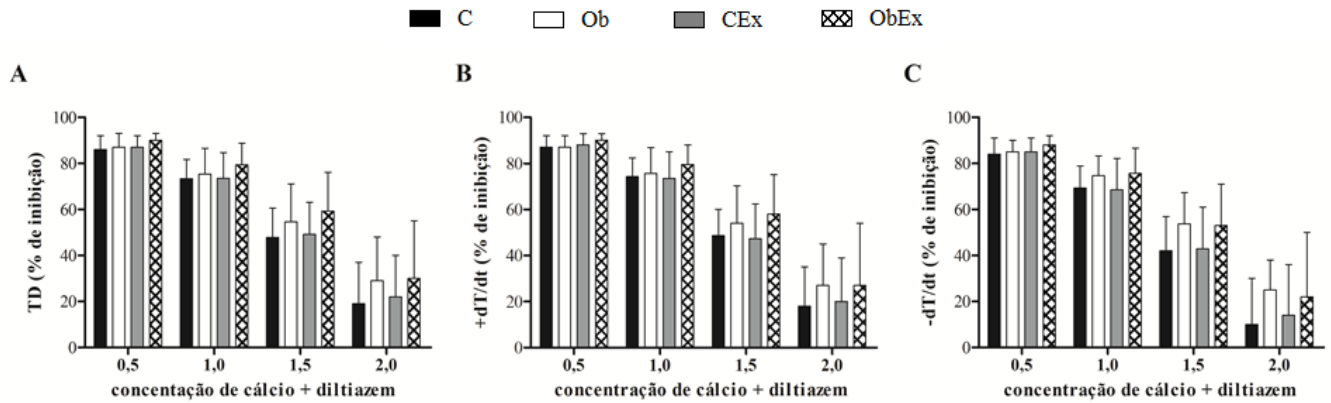


**Figura 11.** Elevação da concentração de cálcio extracelular. Dados expressos em média  $\pm$  desvio-padrão. C: Controle; CEx: controle submetido ao protocolo de treinamento físico; Ob: obeso; ObEx: obeso submetido ao protocolo de treinamento físico. A: TD - tensão máxima desenvolvida; B: +dT/dt - velocidade máxima de variação da tensão desenvolvida; C: -dT/dt - velocidade máxima de variação de decréscimo da tensão desenvolvida. Análise de variância (ANOVA) duas vias para o modelo de medidas repetidas para grupos independentes.

### 3.9.4- Experimento diltiazem

Os efeitos do bloqueio dos canais de  $\text{Ca}^{+2}$  tipo L no músculo papilar, com diltiazem, em porcentagem (%), estão apresentados na Figura 12. Os resultados indicam que a exposição à obesidade e/ou o treinamento físico não acarretaram alterações na resposta funcional entre os grupos em todas as variáveis (TD, +dT/dt e -dT/dt) após bloqueio específico do canal L com diltiazem.

A inibição máxima da TD em resposta ao diltiazem em uma concentração de 0,5 mM de  $\text{Ca}^{+2}$  foi: C:  $86,9\% \pm 6,27$ ; Ob:  $87,0\% \pm 6,54$ ; CEx:  $87,5\% \pm 5,3$  e ObEx:  $90,6\% \pm 3,95$ , porém sem diferenças significativas entre os grupos. É importante ressaltar que o bloqueio com diltiazem promoveu diminuição progressiva intra grupo da TD, +dT/dt e -dT/dt em todas as concentrações de cálcio nos grupos C, CEx, Ob e ObEx.



**Figura 12.** Efeitos do bloqueio dos canais L de cálcio com diltiazem ( $10^{-4}$  M) sobre o músculo papilar isolado dos grupos; C: Controle; CEx: controle submetido ao protocolo de treinamento físico; Ob: obeso; ObEx: obeso submetido ao protocolo de treinamento físico. A: TD - tensão máxima desenvolvida; B: +dT/dt - velocidade máxima de variação da tensão desenvolvida; C: -dT/dt - velocidade máxima de variação de decréscimo da tensão desenvolvida. Dados expressos em média  $\pm$  desvio-padrão. Análise de variância (ANOVA) duas vias para o modelo de medidas repetidas para grupos independentes e complementada com teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

## 4. DISCUSSÃO

O presente estudo investigou os efeitos de um protocolo de treinamento físico, realizado durante 12 semanas em ratos obesos alimentados com dieta hiperlipídica, sobre a função miocárdica e a atividade dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L. Os principais achados foram que a obesidade induzida por dieta hiperlipídica insaturada e o protocolo de treinamento físico não alteraram a função miocárdica e a atividade dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L.

### 4.1- Momento inicial da obesidade

Modelos experimentais de obesidade por dieta hiperlipídica têm sido extensivamente utilizados na literatura com a finalidade de representar o perfil etiológico da obesidade desenvolvida em humanos<sup>(30,66,67,71,137)</sup>. Nesse estudo, a fim de pontuar de maneira correta o tempo de exposição à obesidade, foi determinado o momento inicial da obesidade. Poucos estudos demonstraram o período de indução à obesidade<sup>(72,120)</sup>, o qual é fundamental para atestar o momento no qual os ratos se tornam obesos. No estudo de Verzeletti *et al.*<sup>(120)</sup> o momento inicial da obesidade, induzida por dieta de cafeteria, foi identificado apenas após 90 dias do início do protocolo experimental. No presente estudo, os animais Ob foram alimentados por dieta hiperlipídica rica em ácidos graxos insaturados; devido à maior contribuição energética em relação à dieta padrão, a obesidade teve início a partir da 5ª semana de protocolo experimental. Esses dados são similares aos achados de alguns estudos que apontam que ratos submetidos ao mesmo tipo de dieta, sob as mesmas condições, se tornam obesos após 3 semanas de consumo alimentar<sup>(71,72)</sup>.

#### **4.2- Constituição dos grupos Controle e Obeso**

A primeira etapa de protocolo experimental foi desenvolvida durante 20 semanas, as quais compreendem cinco (5) semanas de indução e 15 semanas de exposição à obesidade. Ao final deste período foram excluídos, a partir do peso corporal, os animais Ob que não apresentaram características de obesidade e os animais C que apresentaram características de obesos. O procedimento de exclusão é fundamental, pois na experimentação biológica, mesmo sob as mesmas condições laboratoriais, animais de grupos distintos podem apresentar características semelhantes. A adoção desse procedimento foi necessária, uma vez que, antes do início do protocolo de treinamento físico havia necessidade de determinar quais animais verdadeiramente apresentavam características de animais controle e/ou obesos. A frequência de descarte de animais após o ponto de separação foi de 32% e 47% nos grupos controle e obeso, respectivamente.

#### **4.3- Protocolo de treinamento físico**

Diversos estudos têm investigado as respostas adaptativas benéficas, estruturais e funcionais, proporcionadas pela prática de exercício físico, em vários sistemas orgânicos, entre eles, o sistema cardiovascular<sup>(34,59,85,100)</sup>. A prática de exercício físico é uma importante ferramenta não-farmacológica frente a prejuízos proporcionados ao coração por várias agressões, tais como: obesidade, infarto do miocárdio, estenose aórtica, entre outras<sup>(6,97,99,108,119,124)</sup>.

Na obesidade, o exercício físico pode ser utilizado como medida de prevenção e/ou tratamento, dado que, o indivíduo ser ou se tornar ativo pode preservar ou restabelecer a função cardíaca, respectivamente<sup>(99)</sup>, prejudicada em consequência ao aumento do tecido adiposo<sup>(6)</sup>. Na literatura, a maioria dos estudos adota o exercício físico como forma de tratamento ao processo patológico desenvolvido no coração consequente a obesidade<sup>(6,54,99)</sup>.

Dentro deste contexto, no presente estudo, o treinamento físico foi utilizado como ferramenta não-farmacológica de tratamento à obesidade e comorbidades associadas. A literatura aponta que 15 semanas de obesidade acarreta prejuízo da função miocárdica associado a alterações nos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L<sup>(66)</sup>. Nesse trabalho, os animais dos grupos C e Ob realizaram o protocolo de treinamento físico aeróbico em esteira, após 15 semanas de exposição à obesidade. Dentro deste contexto, onze animais obesos (ObEx) e quatorze animais controle (CEEx) foram submetidos ao protocolo de treinamento físico durante 12 semanas.

#### **4.4- Perfil nutricional**

As características corporais sofreram relevante influência da dieta hiperlipídica e, posteriormente, da prática de exercício físico. Consistente com investigações prévias que utilizaram a mesma dieta<sup>(66,67,71-74)</sup>, os depósitos de gordura (epididimal: 30%; retroperitoneal: 49,7%; visceral: 42,4%), a gordura corporal total (56%) e o índice de adiposidade (69%), foram substancialmente maiores no grupo Ob em relação ao grupo C. Os resultados da evolução do peso corporal demonstram que a dieta hiperlipídica foi eficiente para tornar os animais obesos na 5ª semana de tratamento e mantê-los obesos até o final do período experimental.

O aumento do tecido adiposo promove alterações plasmáticas de hormônios envolvidos na regulação do apetite, entre eles a leptina<sup>(93,103)</sup>. Esse hormônio, regulador do metabolismo lipídico, é responsável por desencadear o sinal de saciedade e, conseqüentemente, regular a ingestão alimentar<sup>(26)</sup>. Entretanto, a obesidade pode acarretar uma condição denominada resistência à leptina, desencadeando hiperfagia<sup>(33,62,75)</sup>. Estudos experimentais que avaliaram ratos obesos alimentados com dieta hiperlipídica por 15 e 45 semanas e que não desenvolveram resistência à ação da leptina demonstraram diminuição da

ingestão alimentar<sup>(41,66,67,93)</sup>. No entanto, devido ao maior aporte energético da dieta hiperlipídica, a ingestão calórica dos animais obesos permaneceu aumentada<sup>(66,67,93)</sup>, o que promoveu a manutenção da condição obesa.

No presente estudo, o protocolo de treinamento físico utilizado foi capaz de diminuir significativamente o peso corporal dos animais ObEx em relação ao grupo Ob, a partir da 10<sup>a</sup> semana do início do protocolo de treinamento físico. Alguns autores têm mostrado que o treinamento aeróbico é eficiente por atenuar o ganho de peso corporal<sup>(15,23,99,100,111)</sup> e diminuir a adiposidade total em modelos experimentais<sup>(10,15,23,50,77,100,107)</sup>. Em contrapartida, Speretta *et al.*<sup>(113)</sup> propõem que a medida mais importante para a perda de peso corporal é a mudança dos padrões dietéticos, ao passo que, em seu estudo tanto o peso corporal dos animais exercitados como dos sedentários, ambos submetidos à ingestão de dieta hiperlipídica, foi mais alto que o peso corporal dos animais alimentados por dieta padrão. É importante ressaltar que a restrição calórica e a prática de exercício físico separadamente são fundamentais à perda de peso, porém, quando realizados de forma concomitante, potencializam a diminuição da gordura corporal<sup>(121)</sup>. No presente estudo, o protocolo de treinamento físico impediu a progressão do ganho de peso corporal nos animais obesos e promoveu redução do peso corporal final, dos estoques de gordura, da gordura corporal total e do índice de adiposidade nos ratos exercitados em comparação aos seus respectivos controle. O efeito benéfico do treinamento físico sobre o perfil lipídico e, consequentemente, à obesidade, depende das características do exercício físico escolhido, uma vez que, vai definir a maior ou menor mobilização de gordura durante a sessão de treinamento<sup>(113)</sup>.

Nesse estudo, após 32 semanas de protocolo experimental, foi observado abrandamento da influência do aporte calórico da dieta hiperlipídica sobre a composição corporal dos animais que participaram do protocolo de treinamento físico, uma vez que os ratos ObEx apresentaram perfil lipídico similar aos ratos C e CEx ao final do experimento

(Tabela 1). Os resultados sugerem que o protocolo de treinamento físico utilizado foi capaz de interromper a progressão da obesidade mesmo sem mudanças no padrão dietético dos animais. A prática de exercício físico leva à diminuição do tecido adiposo em virtude do alto gasto calórico durante a atividade<sup>(10,15,23,50,77,100,107)</sup>, bem como altera hormônios reguladores do apetite<sup>(48)</sup>. Além disso, autores propõem que o treinamento físico promove diminuição da ingestão alimentar associada à preservação dos níveis dos seguintes peptídeos regulatórios: nesfatin 1 e peptídeo YY<sup>(48)</sup>. Nossos resultados apontam que durante o protocolo de treinamento físico, mesmo sem diferenças estatísticas entre os grupos para ingestão alimentar, houve diminuição da ingestão calórica do grupo ObEx (7%;  $p = 0,048$ ) em relação ao grupo Ob.

Outro aspecto importante foi a eficácia do protocolo de treinamento na diminuição da eficiência alimentar a qual, nos grupos CEx e ObEx, os valores foram 51% e 89% menores em comparação aos grupos C e Ob, respectivamente. Uma explicação possível para esse achado pode estar relacionado à maior eficiência metabólica dos animais exercitados, o que evitou o ganho de peso e de gordura corporal pela dieta hiperlipídica. O aumento da eficiência metabólica, consequente à prática de exercício físico, é caracterizada por adaptações hormonais e moleculares positivas, como: aumento da capacidade de secreção do hormônio do crescimento<sup>(55,112,127)</sup> e das catecolaminas<sup>(56,138)</sup>, melhora na ação da insulina<sup>(11,77,89)</sup> e aumento do consumo de oxigênio pós-exercício (EPOC)<sup>(12,29)</sup>.

Desta forma, com base nos resultados obtidos, é possível atestar que tanto o aumento do gasto calórico quanto a menor ingestão calórica averiguada durante o protocolo de treinamento físico foram importantes para atenuar o processo de ganho de peso corporal e evitar o acúmulo excessivo de gordura no grupo ObEx.

#### 4.5- Comorbidades

A obesidade e o treinamento físico apresentam efeitos inversos no comportamento da pressão arterial e no metabolismo da glicose. Enquanto o treinamento físico acarreta redução da pressão arterial e respostas benéficas no metabolismo da glicose consequente à melhora na sensibilidade à insulina<sup>(15,50,57,61,119)</sup>, a obesidade promove desordens metabólicas caracterizadas por intolerância a glicose, resistência à insulina, hipertensão arterial e dislipidemias em roedores<sup>(66,67,71,102)</sup>.

De acordo com Haram *et al.*<sup>(50)</sup>, o treinamento físico é importante na correção de anormalidades na via da insulina e parâmetros metabólicos, sendo essas vantagens potencializadas com o aumento da intensidade. Portanto, na obesidade, o treinamento físico tem sido considerado uma ferramenta não farmacológica efetiva para atenuar ou diminuir as comorbidades advindas desta doença<sup>(15,43,77,119)</sup>. Nossos resultados mostraram concentrações de glicose aumentadas nos animais CEx e ObEx em relação aos animais C e Ob, respectivamente, após 15 minutos de sobrecarga de glicose. Os animais ObEx, após 30 minutos de sobrecarga glicêmica, apresentaram níveis de glicose mais altos que os animais Ob e CEx, porém após 60, 90 e 120 minutos a glicose foi normalizada, sugerindo que os animais ObEx não desenvolveram intolerância à glicose. Devido aos altos valores de glicose na fase aguda após infusão de glicose intraperitoneal, a AUC do grupo ObEx foi significativamente maior que a do grupo CEx. Segundo Strackowski *et al.*<sup>(115)</sup>, os efeitos metabólicos benéficos do treinamento físico são prejudicados em ratos obesos alimentados com dieta hiperlipídica, uma vez que, não é possível reverter completamente os distúrbios no metabolismo desses animais. Para os autores, é possível que alterações na regulação do glicogênio e triglicerídeos teciduais estejam envolvidas às respostas encontradas, dado que são as duas principais reservas de energia utilizadas pelos músculos em condições basais e/ou durante a prática de exercício físico. Desta forma, indivíduos obesos podem apresentar maior



utilização de triglicerídeos como suporte energético durante o exercício físico, enquanto indivíduos normais têm utilização de glicose aumentada<sup>(115)</sup>. Assim, modificações nos níveis de glicose e triglicerídeos, frequentemente observadas em ratos obesos, podem determinar como esses substratos serão utilizados durante o treinamento físico. É importante ressaltar que a maior parte dos estudos na literatura mostra que a prática de exercício físico melhora os distúrbios metabólicos da glicose associados à má alimentação e obesidade<sup>(17,49,61,84)</sup>.

Dentro deste contexto, nesse estudo, a obesidade não promoveu comorbidades, bem como o treinamento físico não acarretou benefícios no metabolismo da glicose e na pressão arterial. Além disso, com base nos resultados do TTG e da AUC, a interação entre a dieta hiperlipídica e o treinamento físico crônico não apresentou efeito benéfico ao metabolismo da glicose.

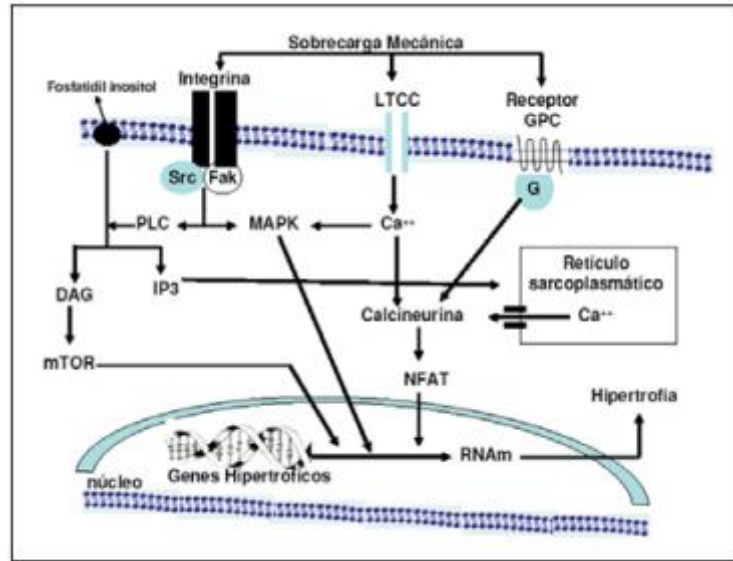
#### **4.6- Remodelação cardíaca**

O treinamento físico demonstra potencial terapêutico para reduzir más adaptações cardíacas desencadeadas pela obesidade, desde que funciona como um mecanismo cardioprotetor em condições normais<sup>(58,59,130)</sup> e patológicas<sup>(50,83,97,99,125)</sup>, promovendo vários benefícios, tais como: hipertrofia fisiológica pela desativação da calcineurina<sup>(86,125,133,136)</sup> e pela sinalização de insulina<sup>(64,106)</sup>, bem como reduz o desenvolvimento de fibrose em hipertrofia patológica estabelecida<sup>(64)</sup>.

Estudos prévios propõem que o treinamento físico melhora a estrutura e a função cardíaca em indivíduos obesos<sup>(16,47)</sup>. Os efeitos benéficos sobre o coração em modelo de obesidade, adquiridos por meio da prática de exercício físico, têm sido associados ao emagrecimento, atenuação da hipertensão arterial<sup>(10,15,50,77)</sup>, além de diminuição da sobrecarga de trabalho sobre as paredes miocárdicas em repouso, fatores que contribuem para a atenuação do estresse cardíaco. Todavia, no presente estudo, o treinamento físico incluído no

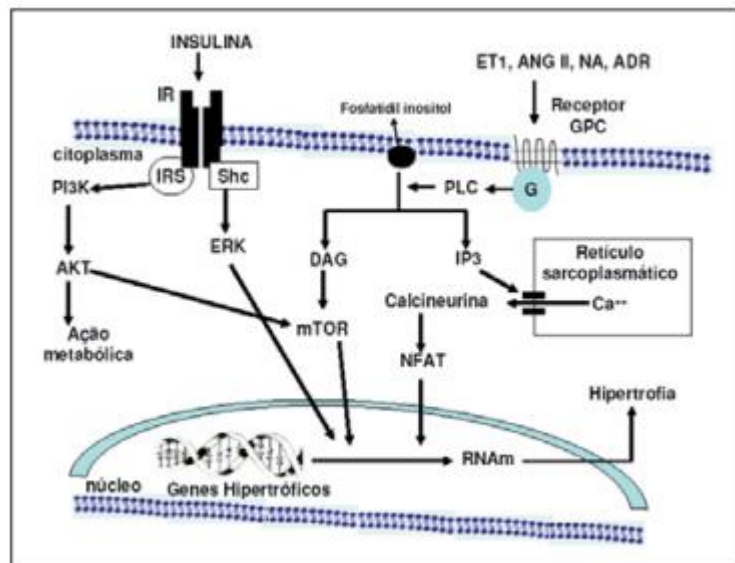
processo de obesidade, sem mudanças dietéticas, não foi capaz de atenuar as mudanças na morfologia miocárdica. Essa resposta foi visualizada pelos valores aumentados de pesos do coração total, átrios, ventrículo direito e ventrículo esquerdo nos dois grupos obesos. O processo hipertrófico miocárdico observado nos animais obesos corrobora com pesquisas anteriores que averiguaram remodelação cardíaca em animais obesos por dieta hiperlipídica<sup>(67,102,92,96,124)</sup>.

Nossos resultados apontam que não houve alterações morfológicas cardíacas induzidas pelo treinamento físico na obesidade, desde que o exercício físico não foi capaz de atenuar o processo hipertrófico. Essa resposta pode estar relacionada à desativação da via da calcineurina e, conseqüentemente, diminuição da atividade da cascata NFAT-calcineurina (Figura 13). A calcineurina é um “gatilho” para a hipertrofia miocárdica pela ativação do fator nuclear ativador de células T (NFAT) em condições patológicas<sup>(8,36,70,95,117)</sup>. A desativação da calcineurina previne que a via de sinalização da hipertrofia patológica seja desencadeada e, conseqüentemente, a remodelação cardíaca precursora de insuficiência cardíaca<sup>(95,136)</sup>. Todavia, Libonati *et al.*<sup>(64)</sup> propõem que a diminuição da atividade da cascata NFAT-calcineurina induzida pelo exercício físico não evita o crescimento do coração devido à ativação da cascata de hipertrofia fisiológica.



**Figura 13.** Vias de sinalização hipertrófica no cardiomiócito em resposta à sobrecarga mecânica. Adaptado de Garcia *et al.*<sup>(42)</sup>.

A hipertrofia fisiológica é caracterizada pelo aumento proporcional do coração, no qual a função cardíaca é mantida ou melhorada, não havendo modificações na expressão de genes associados à função cardíaca e substituição fibrótica<sup>(8,58)</sup>. A prática de exercício físico estimula esse processo adaptativo pela ativação de mecanismos moleculares associados à via proteína kinase B (AKT)-mTOR, responsável pela sinalização intracelular que promove o crescimento fisiológico do coração<sup>(8,35,58)</sup>; no processo de hipertrofia patológica essa cascata de sinalização não está ativada<sup>(58)</sup> (Figura 14).



**Figura 14.** Vias de sinalização hipertrofica no cardiomiócito em resposta estímulos neuro-humorais. Adaptado de Garcia *et al.*<sup>(42)</sup>.

Portanto, no presente estudo, é possível que os animais obesos sedentários tenham apresentado hipertrofia cardíaca via calcineurina-NFAT, enquanto que os obesos treinados podem ter inibido essa via de sinalização patológica, bem como estimulado a hipertrofia fisiológica via AKT-mTOR. Alguns mecanismos podem explicar as características distintas do desenvolvimento hipertrofico cardíaco, seja pela prática de exercício físico ou por algum tipo de patologia.

O estímulo à via AKT-mTOR no processo de hipertrofia fisiológica pode estar relacionado à redução da resistência à insulina pelo treinamento físico, em indivíduos obesos. Medeiros *et al.*<sup>(83)</sup>, demonstraram, em ratos *Wistar* induzidos a obesidade por dieta hiperlipídica, que a prática de exercício físico acarreta redução da resistência à insulina, além de aumentar a capacidade deste hormônio fosforilar a AKT, o que implica em síntese proteica e crescimento fisiológico do coração.

A maior fosforilação da AKT pelo treinamento físico, indiretamente, inibe a cascata de hipertrofia patológica via calcineurina-NFAT por promover menor atividade do trocador de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  tipo 1 (NHE-1)<sup>(136)</sup>. No processo de hipertrofia patológica, por sobrecarga de volume

ou de pressão, há hiperatividade do NHE-1<sup>(5,32,60,136)</sup>. Nessas condições, o aumento da entrada de  $\text{Na}^+$  para o meio intracelular, através do NHE-1, acarreta reversão da estequiometria do trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ , o que resulta no aumento local dos íons  $\text{Ca}^{+2}$  no meio intracelular e promove a ativação da via pró-hipertrófica calcineurina-NFAT<sup>(136)</sup>. É bem estabelecido que o bloqueio desta via de sinalização implica em melhorias e regressão do processo hipertrófico<sup>(5,32,60)</sup>. Como agente não-farmacológico, o treinamento físico é capaz de inibir a hiperatividade do NHE-1 por um tipo de fosforilação inibitória pela ativação da via AKT-mTOR, assim, prevenindo a hipertrofia patológica via calcineurina-NFAT<sup>(136)</sup>. Desta forma, os grupos Ob e ObEx podem ter apresentado processos de remodelação cardíaca por vias distintas, patológica e fisiológica, respectivamente.

#### 4.7- Função miocárdica

A remodelação cardíaca induzida pela obesidade contribui para o desenvolvimento de anormalidades na função cardíaca, resultando em modificações nos cardiomiócitos e trânsito de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular, como visualizado por vários autores<sup>(66,67,73,74,102,103)</sup>. No presente estudo, a obesidade não acarretou prejuízos na função miocárdica, sugerindo um possível efeito cardioprotetor da obesidade crônica por dieta hiperlipídica rica em ácidos graxos insaturados. É possível que a ingestão alimentar aumentada de ácidos graxos insaturados promova maior utilização desses substratos como forma de energia pelo miocárdio, o que em determinadas situações pode promover efeitos benéficos ao coração. De acordo com Lima-Leopoldo *et al.*<sup>(71)</sup>, o tempo prolongado de exposição à dieta hiperlipídica pode acarretar efeito cardioprotetor, evitando alterações funcionais motivadas pela obesidade.

Pesquisas anteriores realizadas em nosso laboratório demonstraram que a obesidade acarretou prejuízo funcional miocárdico decorrente de alterações no trânsito de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular<sup>(71,73)</sup>. Leopoldo *et al.*<sup>(66)</sup> identificaram prejuízo na função miocárdica associado à

danos nos canais de  $\text{Ca}^{+2}$  tipo L após 15 semanas de exposição a obesidade. Entretanto, nossos resultados não demonstraram influência negativa da obesidade nos canais de  $\text{Ca}^{+2}$  miocárdico, visto que o grupo Ob, exposto à obesidade durante todo o protocolo experimental, não apresentou prejuízos na função miocárdica após bloqueio dos canais de  $\text{Ca}^{+2}$  tipo L miocárdico, pela técnica do músculo papilar isolado.

Em contrapartida, o treinamento físico, além de melhorar a função dos cardiomiócitos em condições normais<sup>(18,59,130)</sup>, previne influências negativas promovidas pela obesidade no miocárdio, fato associado a melhorias no trânsito de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular<sup>(99,129)</sup>. Entretanto, nossos resultados demonstraram que não houve alterações na função miocárdica no músculo papilar isolado dos ratos controle e obesos exercitados em condições basais e após manobras que interferem na liberação e recaptura do íon  $\text{Ca}^{+2}$ . Na literatura, a maior parte dos estudos aponta que o protocolo de treinamento físico acarreta melhorias na função cardíaca de ratos obesos<sup>(20,99)</sup>, resultados diferentes dos verificados no presente estudo. Assim, em virtude da obesidade não ter promovido a disfunção cardíaca observada em estudos anteriores, nossos achados não confirmaram a hipótese inicial de que o treinamento físico melhora a função miocárdica e dos canais de  $\text{Ca}^{+2}$  tipo L miocárdico de ratos obesos.

O canal de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L miocárdico tem sido implicado como possível sítio de adaptação pelo treinamento físico, porém os dados na literatura são conflitantes<sup>(86,125)</sup>. Estudos mostram que a prática de exercício físico acarreta adaptações na função e expressão dos canais de  $\text{Ca}^{+2}$ <sup>(116,125)</sup>, no entanto, outros autores não confirmam essas respostas<sup>(86)</sup>. Assim, a ausência de prejuízos nos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  em ratos obesos submetidos ao treinamento físico pode estar relacionada aos mecanismos responsáveis pela regulação desses canais<sup>(105)</sup>, incluindo modulação por vários mensageiros intracelulares, neurotransmissores, vias de fosforilação e hormônios<sup>(90,105)</sup>.

O sistema  $\beta$ -adrenérgico, considerado um dos principais reguladores dos canais de  $\text{Ca}^{+2}$ , poderia estar relacionado às possíveis adaptações ao exercício físico. A literatura tem extensivamente relatado que alterações na sensibilidade dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos, em maior escala  $\beta_1$  no coração, podem afetar a formação de AMPc e a função da proteína kinase A dependente de AMPc (PKA)<sup>(53,123,126,134)</sup> e, consequentemente alterar o estado fosforilado desses canais. A ativação da PKA desencadeia efeitos lusitrópicos, cronotrópicos e inotrópicos no miocárdio<sup>(9)</sup>, entre os quais, potencialização da entrada dos íons  $\text{Ca}^{+2}$  pelos canais L<sup>(53,90,105,123,126,134)</sup>. A partir da prática de exercício físico, diversas adaptações podem ocorrer na PKA, entre as quais estão: maior ativação imediatamente após o exercício<sup>(91)</sup>, aumento da fosforilação dos aparatos miofibrilares (troponina I e proteína C ligada a miosina) e normalização da sensibilidade ao  $\text{Ca}^{+2}$  em ratos infartados<sup>(25)</sup>. Entretanto, em ratos obesos, Paulino *et al.*<sup>(99)</sup> não observaram alterações na expressão proteica e na atividade da PKA após protocolo de treinamento físico em esteira.

Os níveis de catecolaminas circulantes regulam a ativação adrenérgica, sendo que, quando em altos níveis, acarretam ativação sustentada dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos. Essa condição resulta em anormalidades na sinalização do sistema  $\beta$ -adrenérgico e podem, ultimamente, causar patologias cardíacas<sup>(8,21,65,79)</sup>. Por outro lado, o exercício físico promove equilíbrio dos níveis catecolaminérgicos e maior responsividade dos receptores  $\beta$ , apresentando importante papel no funcionamento do sistema  $\beta$ -adrenérgico<sup>(44,68,69,122)</sup>; resposta dependente da intensidade do esforço durante a atividade. O exercício físico realizado em baixa, moderada e alta intensidade parece apresentar efeito benéfico no desempenho do sistema  $\beta$ -adrenérgico<sup>(68,69)</sup> e, consequentemente, na função cardíaca por meio do equilíbrio dos níveis de catecolaminas circulantes<sup>(44)</sup> em distintas situações. Contudo, o exercício extenuante pode promover elevação das concentrações de catecolaminas e, acarretar prejuízos na regulação de toda a cascata de ação adrenérgica<sup>(122)</sup>. Portanto, as adaptações

catecolaminérgicas pelo treinamento físico promovem alterações na ativação do sistema  $\beta$ -adrenérgico, o que poderia influenciar diretamente na função dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$ , bem como no estado fosforilado de outras proteínas que compõem o trânsito de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular.

Os resultados do presente estudo sugerem que o sistema  $\beta$ -adrenérgico não foi alterado pela interação entre a obesidade e o exercício físico. Estudos anteriores em nosso laboratório (*dados não publicados*) demonstraram por meio das técnicas de músculo papilar isolado do VE e Western Blot, que a obesidade induzida por dieta hiperlipídica após 15 semanas acarreta disfunção cardíaca, porém sem prejuízo na sensibilidade dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos, assim como não altera a expressão proteica dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos  $\beta$ -1 e  $\beta$ -2, e da proteína  $G_s\alpha$ , respectivamente. Não foram encontrados estudos que avaliaram os níveis de catecolaminas circulantes em obesos submetidos ao exercício físico.

Outro aspecto importante é que a prática de exercício físico promove restauração de anormalidades na sinalização e responsividade adrenérgica, melhorando a dessensibilização dos receptores  $\beta$  observada em corações com prejuízo funcional (68). Estudos apontam que a resposta adrenérgica positiva em condições patológicas, a partir do protocolo de treinamento físico, está associada à diminuição nos níveis da proteína G acoplada ao receptor kinase 2 miocárdico (GRK2)<sup>(68,78)</sup>, responsável pela dessensibilização  $\beta$ -adrenérgica e abundante em disfunções cardíacas.

Uma explicação alternativa para os nossos achados pode estar relacionada à ação da insulina. Na literatura tem sido sugerido que a insulina pode alterar o influxo de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular e, além disso, modificar o desenvolvimento de força no coração<sup>(2,46)</sup>. O exercício físico promove diversos benefícios ao metabolismo da insulina na obesidade, tais como: melhoria nos níveis de insulina plasmática<sup>(77)</sup>, prevenção da resistência à insulina<sup>(45,89)</sup> e aumento da sensibilidade à insulina<sup>(17,89)</sup>. Portanto, o mecanismo benéfico, via insulina, pode aumentar o influxo de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular e promover melhorias no trânsito de  $\text{Ca}^{2+}$ . No presente



estudo, os resultados de insulina sugerem que o treinamento físico melhora a resistência à insulina e, conseqüentemente, pode levar a manutenção e normalização da atividade dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$ . Desta forma, a manutenção da função dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  averiguada nos ratos ObEx indica que com a prática de exercício físico o desempenho dos principais mecanismos reguladores desses canais permaneceu intacto, mesmo após longo período de exposição à obesidade.

## 5. CONCLUSÃO

A obesidade promove adaptações morfológicas cardíacas sem prejuízos na função miocárdica e atividade dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L. Além disso, os resultados dessa investigação demonstram que o treinamento físico, apesar de modificar a composição corporal, principalmente pela diminuição da quantidade de gordura corporal, não altera as características morfológicas e funcionais do coração, bem como não acarreta adaptações na função dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L.

## 6. REFERÊNCIAS

1. Akiyama T, Tachibana I, Shirohara H, Watanabe N, Otsuki M. High-fat hypercaloric diet induces obesity, glucose intolerance and hyperlipidemia in normal adult male Wistar rat. *Diabetes Res Clin Pract* 1996; 31:27-35.
2. Aulbach F, Simm A, Maier S, Langenfeld H, Walter U, Kersting U, Kirstein M. Insulin stimulates the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current in rat cardiac myocytes. *Cardiovasc Res.* 1999; 42(1):113-20.
3. Aggarwal R, Boyden PA. Diminished  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Ba}^{2+}$  currents in myocytes surviving in the epicardial border zone of the 5-day infarcted canine heart. *Circ Res.* 1995; 77(6):1180-91.
4. Balke CW, Shorofsky SR. Alterations in calcium handling in cardiac hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res.* 1998; 37(2):290-99.
5. Baartscheer A, Schumacher CA, van Borren MM, Belterman CN, Coronel R, Opthof T, Fiolet JW. Chronic inhibition of  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger attenuates cardiac hypertrophy and prevents cellular remodeling in heart failure. *Cardiovasc Res.* 2005; 65(1):83-92.
6. Barretti DLM, Carmo EC, Rosa KT, Irigoyen MCC, Oliveira EM. Aerobic exercise training revert pathologic cardiac hypertrophy and improves the diastolic function in obese Zucker rats. *Rev Bras Educ Fís Esporte.* 2011; 25(4):593-605.
7. Benevenga NJ, Calvert C, Eckhert CD, Fahey GC, Greger JL, Keen CL, Knapka JJ, Magalhaes H, Oftedal OT, Reeves PG, Shaw HA, Smith JE, Steele RD. 1995. *Nutrient Requirements of the Laboratory Rat*. Washington, DC: National Academy Press.
8. Bernardo BC, Weeks KL, Pretorius L, McMullen JR. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacol Ther.* 2010; 128(1): 191-227.

9. Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*. 2002; 415(6868):198-205.
10. Botezelli JD, Cambri LT, Ghezzi AC, Dalia RA, M Scariot PP, Ribeiro C, Voltarelli FA, Mello MA. Different exercise protocols improve metabolic syndrome markers, tissue triglycerides content and antioxidant status in rats. *Diabetol Metab Syndr*. 2011; 19;3:35.
11. Borghouts LB, Keizer HA. Exercise and insulin sensitivity: a review. *Int J Sports Med*. 2000; 21(1):1-12.
12. Børsheim E, Bahr R. Effect of exercise intensity, duration and mode on post-exercise oxygen consumption. *Sports Med*. 2003; 33(14):1037-60.
13. Brasil. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009. Antropometria e análise do estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil. Rio de Janeiro: IBGE, 2010.
14. Bracken N, Howarth FC, Singh J. Effects of streptozotocin-induced diabetes on contraction and calcium transport in rat ventricular cardiomyocytes. *Ann N Y Acad Sci*. 2006; 1084:208-222.
15. Burneiko RC, Diniz YS, Galhardi CM, Rodrigues HG, Ebaid GM, Faine LA, Padovani CR, Cicogna AC, Novelli EL. Interaction of hypercaloric diet and physical exercise on lipid profile, oxidative stress and antioxidante defenses. *Food Chem Toxicol*. 2006; 44(7):1167-72.
16. Cameron I, Alam MA, Wang J, Brown L. Endurance exercise in a rat model of metabolic syndrome. *Can J Physiol Pharmacol*. 2012; 90(11):1490-7.
17. Caponi PW, Lehen AM, Pinto GH, Borges J, Markoski M, Machado UF, Schaan BD. Aerobic exercise training induces metabolic benefits in rats with metabolic syndrome independent of dietary changes. *Clinics (Sao Paulo)*. 2013; 68(7):1010-7.

18. Carneiro-Júnior MA, Prímola-Gomes TN, Quintão-Júnior JF, Drummond LR, Lavorato VN, Drummond FR, Felix LB, Oliveira EM, Cruz JS, Natali AJ, Mill JG. Regional effects of low-intensity endurance training on structural and mechanical properties of rat ventricular myocytes. *J Appl Physiol* (1985). 2013; 115(1):107-15.
19. Carroll JF, Zenebe WJ, Strange TB. Cardiovascular function in a rat model of diet-induced obesity. *Hypertension*. 2006; 48(1):65-72.
20. Carvalho de Lima D, Guimarães JB, Rodovalho GV, Silveira SA, Haibara AS, Coimbra CC. Exercise training starting at weaning age preserves cardiac pacemaker function in adulthood of diet-induced obese rats. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2014; 39(8):888-94.
21. Choi DJ, Koch WJ, Hunter JJ, Rockman HA. Mechanism of beta-adrenergic receptor desensitization in cardiac hypertrophy is increased beta-adrenergic receptor kinase. *J Biol Chem*. 1997; 272(27):17223-9.
22. Cicogna AC, Padovani CR, Okoshi K, Aragon FF, Okoshi MP. Myocardial function during chronic food restriction in isolated hypertrophied cardiac muscle. *Am J Med Sci*. 2000; 320(4):244-248.
23. Dantas EM, Pimentel EB, Gonçalves CP, Lunz W, Rodrigues SL, Mill JG. Effects of chronic treadmill training on body mass gain and visceral fat accumulation in overfed rats. *Braz J Med Biol Res*. 2010; 43(5):515-21.
24. De Tomasi LC, Bruno A, Sugizaki MM, Lima-Leopoldo AP, Nascimento AF, Júnior SA, Pinotti MF, Padovani CR, Leopoldo AS, Cicogna AC. Food restriction promotes downregulation of myocardial L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Can J Physiol Pharmacol*. 2009; 87(6):426-31.
25. de Waard MC, van der Venden J, Ozdemir S, Biesmans L, Boontje NM, Dekkers DH, Schoonderwoerd K, Shuurbijs HC, de Crom R, Stienen GJ, Sipido KR, Lamers JM, Duncker DJ. Early exercise training normalizes myofilament function and attenuates left ventricular pump dysfunction in mice with a large myocardial infarction. *Cir Res*. 2007; 100(7):1079-88.

26. Dong F, Ren J. Fitness or fatness - the debate continues for the role of leptin in obesity associated heart dysfunction. *Curr Diabetes Rev.* 2007; 3(3):159–64.
27. Dong F, Zhang X, Yang X, Esberg LB, Yang H, Zhang Z, Culver B, Ren J. Impaired cardiac contractile function in ventricular myocytes from leptin-deficient ob/ob obese mice. *J Endocrinol.* 2006; 188(1):25-36.
28. Dourmashkin JT, Chang GQ, Gayles EC, Hill JO, Fried SK, Julien C, Leibowitz SF. Different forms of obesity as a function of diet composition. *Int J Obes.* 2005; 29(11):1368-78.
29. Drummond MJ, Vehrs PR, Schaalje GB, Parcell AC. Aerobic and resistance exercise sequence affects excess post exercise oxygen consumption. *J Strength Cond Res.* 2005; 19(2):332-7.
30. Du Toit EF, Nabben M, Lochner A. A potential role for angiotensin II in obesity induced cardiac hypertrophy and ischaemic/reperfusion injury. *Basic Res Cardiol.* 2005; 100(4):346-54.
31. Eckel RH, Barouch WW, Ershow AG. Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute-National of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases Working Group on the Pathophysiology of Obesity-Associated Cardiovascular Disease. *Circulation.* 2002; 105(24):2923-28.
32. Ennis IL, Garciarena CD, Escudero EM, Pérez NG, Dulce RA, Camilón de Hurtado MC, Cingolani HE. Normalization of the calcineurin pathway underlies the regression of hypertensive hypertrophy induced by Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger-1 (NHE-1) inhibition. *Can J Physiol Pharmacol.* 2007; 85(3-4):301-10.
33. Fam BC, Morris MJ, Hansen MJ, Kebede M, Andrikopoulos S, Proietto J, Thorburn AW. Modulation of central leptin sensitivity and energy balance in a rat model of diet-induced obesity. *Diabetes Obes Metab.* 2007; 9(6):840-52.

34. Farid R, Azad FJ, Atri AE, Rahimi MB, Khaledan A, Talaei-Khoei M, Ghafari J, Ghasemi R. Effect of aerobic exercise training on pulmonary function and tolerance of activity in asthmatic patients. *Iran J Allergy Asthma Immunol*. 2005; 4(3):133-8.
35. Fernandes T, Soci UP, Oliveira EM. Eccentric and concentric cardiac hypertrophy induced by exercise training: microRNAs and molecular determinants. *Braz J Med Biol Res*. 2011; 44(9):836-47.
36. Fiedler B, Lohmann SM, Smolenski A, Linnemuller S, Pieske B, Schroder F, Molkentin JD, Drexler H, Wollert KC. Inhibition of calcineurin-NFAT hypertrophy signaling by cGMP-dependent protein kinase type I in cardiacmyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99(17):11363-8.
37. Fitzgerald SM, Henegar JR, Brands MW, Henegar LK, Hall JE. Cardiovascular and renal responses to a high-fat diet in Osborne-Mendel rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2001; 281(2):R547-52.
38. Fontaine KR, Redden DT, Wang C, Westfall AO, Allison DB. Years of Life lost due to obesity. *JAMA*. 2003; 289(2):187-93.
39. Francischi RP, Pereira LO, Freitas CS, Klopfer M, Santos RC, Vieira P, Lancha Júnior AH. Obesidade: atualização sobre sua etiologia, morbidade e tratamento. *Rev Nutr*. 2000; 13(1):17-28.
40. Francischi RP, Pereira LO, Lancha Júnior AH. Exercício, comportamento alimentar e obesidade: revisão dos efeitos sobre a composição corporal e parâmetros metabólicos. *Rev Paul Educ Fís*. 2001; 15(2):117-40.
41. Freire PP, Alves CA, de Deus AF, Leopoldo AP, Leopoldo AS, da Silva DC, de Tomasi LC, Campos DH, Cicogna AC. Obesity does not lead to imbalance between myocardial phospholamban phosphorylation and dephosphorylation. *Arq Bras Cardiol*. 2014; 103(1):41-50.

42. Garcia JA, Incerp EK. Factors and mechanisms involved in left ventricular hypertrophy and the anti-hypertrophic role of nitric oxide. *Arq Bras Cardiol.* 2008; 90(6):409-16.
43. Gauthier MS, Couturier K, Charbonneau A, Lavoie JM. Effects of introducing physical training in the course of a 16-week high-fat diet regimen on hepatic steatosis, adipose tissue, fat accumulation and plasma lipid profile. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2004; 28(8):1064-71.
44. Gavrilovic L, Spasojevic N, Dronjak S. Modulation of catecholamine-synthesizing enzymes in adrenal medulla and stellate ganglia by treadmill exercise of stressed rats. *Eur J Appl Physiol.* 2012; 112(3):1177-82.
45. Gomes RM, Tófolo LP, Rinaldi W, Scomparin DX, Grassioli S, Barella LF, de Oliveira JC, Branco RC, Agostinho AR, Ribeiro TA, Gravena C, Mathias PC. Moderate exercise restores pancreatic beta-cell function and autonomic nervous system activity in obese rats induced by high-fat diet. *Cell Physiol Biochem.* 2013; 32(2):310-21.
46. Gupta MP, Lee SL, Dhalla NS. Activation of heart sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -stimulated adenosine triphosphatase by insulin. *J Pharmacol Exp Ther.* 1989; 249(2):623-30.
47. Hafstad AD, Lund J, Hadler-Olsen E, Höper AC, Larsen TS, Aasum E. High- and moderate-intensity training normalizes ventricular function and mechanoenergetics in mice with diet-induced obesity. *Diabetes.* 2013; 62(7):2287-94.
48. Haghshenas R, Jafari M, Ravasi Aliasghar, Kordi M, Gilani N, Shariatzadeh M, Hedayati M, Rahimi M. The effect of eight weeks endurance training and high-fat diet on appetite-regulating hormones in rat plasma. *Iran J Basic Med Sci.* 2014; 17(4):237–43.
49. Hamed NS, Raoof NALA. Effect of high intensity interval training on diabetic obese women with polyneuropathy: a randomized controlled clinical trial. *Physical Therapy and Rehabilitation.* 2014.



50. Haram PM, Kemi OJ, Lee SJ, Bendheim MØ, Al-Share QY, Waldum HL, Gilligan LJ, Koch LG, Britton SL, Najjar SM, Wisløff U. Aerobic interval training vs. continuous moderate exercise in the metabolic syndrome of rats artificially selected for low aerobic capacity. *Cardiovasc Res.* 2009; 81(4):723-32.
51. Hockerman GH, Dilmac N, Scheuer T, Catterall WA. Molecular determinants of diltiazem block in domains IIS6 and IVS6 of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Mol Pharmacol.* 2000; 58(6):1264-70.
52. Hu FB, Willett WC, Li T, Stampfer MJ, Colditz GA, Manson JE. Adiposity as compared with physical activity in predicting mortality among women. *N Engl J Med.* 2004; 351(26):2694-2703.
53. Hulme JT, Westenbroek RE, Scheuer T, Catterall WA. Phosphorylation of serine 1928 in the distal C-terminal domain of cardiac  $\text{CaV1.2}$  channels during  $\beta$ 1-adrenergic regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103(44):16574-9.
54. Ingul CB, Tjonna AE, Stolen TO, Stoylen A, Wisloff U. Impaired cardiac function among obese adolescents: effect of aerobic interval training. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2010; 164(9):852-9.
55. Irving BA, Weltman JY, Patrie JT, Davis CK, Brock DW, Swift D, Barrett EJ, Gaesser GA, Weltman A. Effects of exercise training intensity on nocturnal growth hormone secretion in obese adults with the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009; 94(6):1979-86.
56. Jacob C, Zouhal H, Prioux J, Gratas-Delamarche A, Bentué-Ferrer D, Delamarche P. Effect of the intensity of training on catecholamine responses to supramaximal exercise in endurance-trained men. *Eur J Appl Physiol.* 2004; 91(1):35-40.
57. Jodas EM, Voltera AF, Ginoza M, Kohlmann Junior O, Santos NB, Cesaretti ML. Effects of physical training and potassium supplementation on blood pressure, glucose metabolism and albuminuria of spontaneously hypertensive rats. *J Bras Nefrol.* 2014; 36(3):271-279.

58. Kemi OJ, Ceci M, Wisloff U, Grimaldi S, Gallo P, Smith GL, Condorelli G, Ellingsen O. Activation and inactivation of cardiac Akt/mTOR signaling diverges physiological from pathological hypertrophy. *J Cell Physiol.* 2008; 214(2):316-21.
59. Kemi OJ, Ellingsen O, Ceci M, Grimaldi S, Smith GL, Condorelli G, Wisloff U. Aerobic interval training enhances cardiomyocyte contractility and  $\text{Ca}^{+2}$  cycling by phosphorylation of CaMKII and Thr-17 of phospholamban. *J Mol Cell Cardiol.* 2007; 43(3):354–61.
60. Kilic A, Velic A, De Windt LJ, Fabritz L, Voss M, Mitko D, Zwiener M, Baba HA, van Eickels M, Schlatter E, Kuhn M. Enhanced activity of the myocardial  $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$  exchanger NHE-1 contributes to cardiac remodeling in atrial natriuretic peptide receptor-deficient mice. *Circulation.* 2005; 112(15):2307-17.
61. Kim CH, Youn JH, Park JY, Hong SK, Park KS, Park SW, Suh KI, Lee KU. Effects of high-fat diet and exercise training on intracellular glucose metabolism in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000; 278(6):E977-84.
62. Koch CE, Lowe C, Pretz D, Steger J, Williams LM, Tups A. High-fat diet induces leptin resistance in leptin-deficient mice. *J Neuroendocrinol.* 2014; 26(2):58-67.
63. Korner J, Aronne LJ. The emerging of body weight regulation and its impact on obesity treatment. *J Clin Invest.* 2003; 111(5):565-70.
64. Libonati JR. Cardiac Effects of Exercise Training in Hypertension. *ISRN Hypertension.* 2013.
65. Lefkowitz RJ, Rockman HA, Koch WJ. Catecholamines, cardiac beta-adrenergic receptors, and heart failure. *Circulation.* 2000; 101(14):1634-7.
66. Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, Sugizaki MM, Nascimento AF, Campos DH, Luvizotto RA, Castardeli E, Alves CA, Brum PC, Cicogna AC. Involvement of L-type calcium channel and SERCA2A in myocardial dysfunction induced by obesity. *J Cell Physiol.* 2011; 226(11):2934-42.

67. Leopoldo AS, Sugizaki MM, Lima-Leopoldo AP, Nascimento AF, Luvizotto RA, Campos DH, Okoshi K, Dal Pai-Silva M, Padovani CR, Cicogna AC. Cardiac remodeling in a rat model of diet-induced obesity. *Can J Cardiol*. 2010; 26(8):423-29.
68. Leosco D, Rengo G, Iaccarino G, Golino L, Marchese M, Fortunato F, Zincarelli C, Sanzari E, Ciccarelli M, Galasso G, Altobelli GG, Conti V, Matrone G, Cimini V, Ferrara N, Filippelli A, Koch WJ, Rengo F. Exercise promotes angiogenesis and improves beta-adrenergic receptor signalling in the post-ischaemic failing rat heart. *Cardiovasc Res*. 2008; 78(2):385-94.
69. Leosco D, Rengo G, Iaccarino G, Filippelli A, Lymperopoulos A, Zincarelli C, Fortunato F, Golino L, Marchese M, Esposito G, Rapacciuolo A, Rinaldi B, Ferrara N, Koch WJ, Rengo F. Exercise training and beta-blocker treatment ameliorate age-dependent impairment of beta-adrenergic receptor signaling and enhance cardiac responsiveness to adrenergic stimulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007; 293(3):1596-603.
70. Lim HW, De Windt LJ, Steinberg L, Taigen T, Witt SA, Kimball TR, Molkentin JD. Calcineurin expression, activation, and function in cardiac pressure-overload hypertrophy. *Circulation*. 2000; 101(20):2431-7.
71. Lima-Leopoldo AP, Leopoldo AS, Silva DC, do Nascimento AF, Campos DH, Luvizotto RA, de Deus AF, Freire PP, Medeiros A, Okoshi K, Cicogna AC. Long-term obesity promotes alterations in diastolic function induced by reduction of phospholamban phosphorylation at serine-16 without affecting calcium handling. *J Appl Physiol*. 2014; 117:669-78.
72. Lima-Leopoldo AP, Leopoldo AS Silva DCT, Nascimento AF, Campos DHS, Luvizotto RAM, Júnior SAO, Padovani CR, Nogueira CR, Cicogna AC. Influência de prolongados períodos de obesidade sobre a expressão gênica miocárdica. *Arq. Bras. Cardiol*. 2013; 100(3):229-37.
73. Lima-Leopoldo AP, Leopoldo AS, Sugizaki MM, Bruno A, Nascimento AF, Luvizotto RA, Oliveira Júnior SA, Castardeli E, Padovani CR, Cicogna AC. Myocardial

dysfunction and abnormalities in intracellular calcium handling in obese rats. *Arq Bras Cardiol.* 2011; 97(3):232-40.

74. Lima-Leopoldo AP, Sugizaki MM, Leopoldo AS, Carvalho RF, Nogueira CR, Nascimento AF, Martinez PF, Luvizotto RA, Padovani CR, Cicogna AC. Obesity induces upregulation of genes involved in myocardial  $\text{Ca}^{2+}$  handling. *Braz J Med Biol Res.* 2008; 41(7):615-20.
75. Lin S, Thomas TC, Storlien LH, Huang XF. Development of high fat diet-induced obesity and leptin resistance in C57Bl/6J mice. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2000; 24(5):639-46.
76. Locatelli J, Assis LVM, Isoldi MC. Calcium handling proteins: structure, function and modulation by exercise. *Heart Fail Rev.* 2014; 19(2):207-25.
77. Machado MV, Vieira AB, Nascimento AR, Martins RL, Daleprane JB, Lessa MA, Tibiriçá E. Physical Exercise Restores Microvascular Function in Obese Rats with Metabolic Syndrome. *Metab Syndr Relat Disord.* 2014; 12(9):484-492.
78. MacDonnell SM, Kubo H, Crabbe DL, Renna BF, Reger PO, Mohara J, Smithwick LA, Koch WJ, Houser SR, Libonati JR. Improved myocardial beta-adrenergic responsiveness and signaling with exercise training in hypertension. *Circulation.* 2005; 111(25):3420-8.
79. Madamanchi A. Beta-adrenergic receptor signaling in cardiac function and heart failure. *Mcgill J Med.* 2007; 10(2):99-104.
80. Malnick SD, Knobler H. The medical complications of obesity. *QJM.* 2006; 99(9):565-79.
81. Mathew B, Patel SB, Reams GP, Freeman RH, Spear RM, Villarreal D. Obesity-hypertension: emerging concepts in pathophysiology and treatment. *Am J Med Sci.* 2007; 334(1):23-30.

82. Matsubara LS, Matsubara BB, Okoshi MP, Cicogna AC, Janicki JS. Alterations in myocardial collagen content affect rat papillary muscle function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000; 279(4):H1534-9.
83. Medeiros A, Rolim NPL, Oliveira RSF, Rosa KT, Mattos KC, Casarini DE, Irigoyen MC, Krieger EM, Krieger JE, Negrão CE, Brum PC. Exercise training delays cardiac dysfunction and prevents calcium handling abnormalities in sympathetic hyperactivity-induced heart failure mice. *J Appl Physiol*. 2008; 104(1):103-9.
84. Mello MA, Souza CT, Braga LR, dos Santos JW, Ribeiro IA, Gobatto CA. Glucose tolerance and insulin action in monosodium glutamate (MSG) obese exercise-trained rats. *Physiol Chem Phys Med NMR*. 2001; 33(1):63-71.
85. Moinuddin I, Leehey DJ. A comparison of aerobic exercise and resistance training in patients with and without chronic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2008; 15(1):83-96.
86. Mokolke EA, Palmer BM, Cheung JY, Moore RL. Endurance training does not affect intrinsic calcium current characteristics in rat myocardium. *Am J Physiol*. 1997; 273(3 Pt 2):1193-7.
87. Monteiro CA, Mondini L, de Souza AL, Popkin BM. The nutrition transition in Brazil. *Eur J Clin Nutr*. 1995; 49(2):105-13.
88. Moraes-Silva IC, De La Fuente RN, Mostarda C, Rosa K, Flues K, Damaceno-Rodrigues NR, Caldini EG, De Angelis K, Krieger EM, Irigoyen MC. Baroreflex deficit blunts exercise training-induced cardiovascular and autonomic adaptations in hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2010; 37(3):e114-20.
89. Mostarda C, Moraes-Silva IC, Salemi VM, Machi JF, Rodrigues B, De Angelis K, Farah Vde M, Irigoyen MC. Exercise training prevents diastolic dysfunction induced by metabolic syndrome in rats. *Clinics (Sao Paulo)*. 2012; 67(7):815-20.

90. Mukherjee R, Spinale FG. L-type calcium channel abundance and function with cardiac hypertrophy and failure: a review. *J Mol Cell Cardiol.* 1998; 30(10):1899-916.
91. Müller AE, Kreiner M, Kötter S, Lassak P, Bloch W, Suhr F, Krüger M. Acute exercise modifies titin phosphorylation and increases cardiac myofilament stiffness. *Front Physiol.* 2014; 5:449.
92. Nascimento AR, Machado M, de Jesus N, Gomes F, Lessa MA, Bonomo IT, Tibiriçá E. Structural and functional microvascular alterations in a rat model of metabolic syndrome induced by a high-fat diet. *Obesity (Silver Spring).* 2013; 21(10):2046-54.
93. Nascimento AF, Luvizotto RA, Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, Seiva FR, Justulin LA Jr, Silva MD, Okoshi K, Wang XD, Cicogna AC. Long-term high-fat diet-induced obesity decreases the cardiac leptin receptor without apparent lipotoxicity. *Life Sci.* 2011; 88(23-24):1031-8.
94. O'Brien PE, Dixon JB. The extent of the problem of obesity. *Am J Surg.* 2002; 184(6B):4S-8.
95. Oliveira RS, Ferreira JC, Gomes ER, Paixão NA, Rolim NP, Medeiros A, Guatimosim S, Brum PC. Cardiac anti-remodelling effect of aerobic training is associated with a reduction in the calcineurin/NFAT signaling pathway in heart failure mice. *J Physiol.* 2009; 587(Pt 15):3899-910.
96. Panchal SK, Poudyal H, Iyer A, Nazer R, Alam A, Diwan V, Kauter K, Sernia C, Campbell F, Ward L, Gobe G, Fenning A, Brown L. High-carbohydrate, high-fat diet-induced metabolic syndrome and cardiovascular remodeling in rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2011; 57(5):611-24.
97. Pacagnelli FL, Okoshi K, Campos DHS, Rodrigo Wagner Alves De Souza, Carlos Roberto Padovani, Robson Francisco Carvalho, Andreo Fernando Aguiar, Maeli Dal Pai and Antônio Carlos Cicogna. Physical training attenuates cardiac remodeling in rats with supra-aortic stenosis. *Exp Clin Cardiol.* 2014; 20(8):1-17.

98. Pardo Silva MC, De Laet C, Nusselder WJ, Mamun AA, Peeters A. Adult obesity and number of years lived with and without cardiovascular disease. *Obesity*. 2006; 14(7):1264-73.
99. Paulino EC, Ferreira JC, Bechara LR, Tsutsui JM, Mathias Júnior W, Lima FB, Casarini DE, Cicogna AC, Brum PC, Negrão CE. Exercise training and caloric restriction prevent reduction in cardiac  $\text{Ca}^{2+}$ -handling protein profile in obese rats. *Hypertension*. 2010; 56(4):629-35.
100. Pinheiro-Mulder A, Aguila MB, Bregman R, Mandarin-de-Lacerda CA. Exercise counters diet-induced obesity, proteinuria, and structural kidney alterations in rat. *Pathol Res Pract*. 2010; 206(3):168-73.
101. Poirier P, Giles TD, Bray GA, Hong Y, Stern JS, Pi-Sunyer FX, Eckel RH. Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006; 26(5):968-76.
102. Relling DP, Esberg LB, Fang CX, Johnson WT, Murphy EJ, Carlson EC, Saari JT, Ren J. High-fat diet-induced juvenile obesity leads to cardiomyocyte dysfunction and upregulation of Foxo3a transcription factor independent of lipotoxicity and apoptosis. *J Hypertens*. 2006; 24(3):549-61.
103. Ren J, Zhu BH, Relling DP, Esberg LB, Ceylan-Isik AF. High-fat diet-induced obesity leads to resistance to leptin-induced cardiomyocyte contractile response. *Obesity*. 2008; 16(11):2417-23.
104. Ren J, Walsh MF, Jefferson L, Natavio M, Ilg KJ, Sowers JR, Brown RA. Basal and ethanol-induced cardiac contractile response in lean and obese Zucker rat hearts. *J Biomed Sci*. 2000; 7(5):390-400.
105. Richard S, Perrier E, Fauconnier J, Perrier R, Pereira L, Gómez AM, Benitah JP.  $\text{Ca}^{+2}$ -induced  $\text{Ca}^{+2}$  entry or how the L-type  $\text{Ca}^{+2}$  channel remodels its own signalling pathway in cardiac cells. *Prog Biophys Mol Biol*. 2006; 90:118-35.

106. Riehle C, Wende AR, Zhu Y, Oliveira KJ, Pereira RO, Jaishy BP, Bevins J, Valdez S, Noh J, Kim BJ, Moreira AB, Weatherford ET, Manivel R, Rawlings TA, Rech M, White MF, Abel ED. Insulin Receptor Substrates Are Essential for the Bioenergetic and Hypertrophic Response of the Heart to Exercise Training. *Mol. Cell. Biol.* 2014; 34(18):3450-60.
107. Rinaldi W, Gomes RM, Scomparin DX, Grassioli S, Ribeiro TA, Fabricio GS, Barella LF, Pavanello A, Trombini AB, Mathias PC, de Oliveira JC. Low-intensity and moderate exercise training improves autonomic nervous system activity imbalanced by postnatal early overfeeding in rats. *J Int Soc Sports Nutr.* 2014; 11:25.
108. Rodrigues B, Santana AA, Santamarina AB, Oyama LM, Caperuto EC, de Souza CT, Barboza CA, Rocha LY, Figueroa D, Mostarda C, Irigoyen MC, Lira FS. Role of training and detraining on inflammatory and metabolic profile in infarcted rats: influences of cardiovascular autonomic nervous system. *Mediators Inflamm.* 2014; 2014:207131.
109. Rodrigues B, Figueroa DM, Mostarda CT, Heeren MV, Irigoyen MC, De Angelis K. Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in streptozocin-diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol.* 2007; 6:38.
110. Rolls BJ, Shide DJ. The influence of dietary fat on food intake and body weight. *Nutr Rev.* 1992; 50(10):283-90.
111. Sene-Fiorese M, Duarte FO, Scarmagnani FR, Cheik NC, Manzoni MS, Nonaka KO, Rossi EA, de Oliveira Duarte AC, Dâmaso AR. Efficiency of intermittent exercise on adiposity and fatty liver in rats fed with high-fat diet. *Obesity (Silver Spring).* 2008; 16(10):2217-22.
112. Seo DI, Jun TW, Park KS, Chang H, So WY, Song W. 12 weeks of combined exercise is better than aerobic exercise for increasing growth hormone in middle-aged women. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* 2010; 20(1):21-6.



113. Speretta GF, Rosante MC, Duarte FO, Leite RD, Lino AD, Andre RA, Silvestre JG, Araujo HS, Duarte AC. The effects of exercise modalities on adiposity in obese rats. *Clinics (Sao Paulo)*. 2012; 67(12):1469-77.
114. Stein CJ, Colditz GA. The epidemic of obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; 89(6):2522-25.
115. Straczkowski M, Kowalska I, Dzienis-Straczowska S, Kinalski M, Górski J, Kinalska I. The effect of exercise training on glucose tolerance and skeletal muscle triacylglycerol content in rats fed with a high-fat diet. *Diabetes Metab*. 2001; 27(1):19-23.
116. Sugizaki MM, Leopoldo AP, Conde SJ, Campos DS, Damato R, Leopoldo AS, Nascimento AF, Oliveira Júnior SA, Cicogna AC. Upregulation of mRNA myocardium calcium handling in rats submitted to exercise and food restriction. *Arq Bras Cardiol*. 2011; 97(1):46-52.
117. Sussman MA, Lim HW, Gude N, Taigen T, Olson EN, Robbins J, Colbert MC, Gualberto A, Wieczorek DF, Molkentin JD. Prevention of cardiac hypertrophy in mice by calcineurin inhibition. *Science*. 1998; 281(5383):1690-3.
118. Taylor BA, Phillips SJ. Detection of obesity QTLs on mouse chromosomes 1 and 7 by selective DNA pooling. *Genomics*. 1996; 34(3):389-98.
119. Touati S, Meziri F, Devaux S, Berthelot A, Touyz RM, Laurant P. Exercise reverses metabolic syndrome in high-fat diet-induced obese rats. *Med Sci Sports Exerc*. 2011; 43(3):398-407.
120. Verzeletti GN, Gaio EJ, Linhares DS, Rosing CK. Effect of obesity on alveolar bone loss in experimental periodontitis in Wistar rats. *J Appl Oral Sci*. 2012; 20(2):218–21.
121. Vieira VJ, Valentine RJ, Wilund KR, Antao N, Baynard T, Woods JA. Effects of exercise and low-fat diet on adipose tissue inflammation and metabolic complications in obese mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009; 296(5):E1164-71.

122. Vitiello D, Boissière J, Doucende G, Gayrard S, Polge A, Faure P, Goux A, Tanguy S, Obert P, Reboul C, Nottin S.  $\beta$ -Adrenergic receptors desensitization is not involved in exercise-induced cardiac fatigue: NADPH oxidase-induced oxidative stress as a new trigger. *J Appl Physiol* (1985). 2011; 111(5):1242-8.
123. Wallukat G. The beta-adrenergic receptors. *Herz*. 2002; 27(7):683-90.
124. Wang HT, Liu CF, Tsai TH, Chen YL, Chang HW, Tsai CY, Leu S, Zhen YY, Chai HT, Chung SY, Chua S, Yen CH, Yip HK. Effect of obesity reduction on preservation of heart function and attenuation of left ventricular remodeling, oxidative stress and inflammation in obese mice. *J Transl Med*. 2012; 11;10:145.
125. Wang S, Ma JZ, Zhu SS, Xu DJ, Zou JG, Cao KJ. Swimming training can affect intrinsic calcium current characteristics in rat myocardium. *Eur J Appl Physiol*. 2008; 104(3):549–555.
126. Weiss S, Oz S, Benmocha A, Dascal N. Regulation of Cardiac L-Type  $\text{Ca}^{2+}$  Channel  $\text{Ca}_v1.2$  Via the  $\beta$ -Adrenergic-cAMP-Protein Kinase A Pathway: Old Dogmas, Advances, and New Uncertainties. *Circ Res*. 2013; 113:617-631.
127. Weltman A, Weltman JY, Watson Winfield DD, Frick K, Patrie J, Kok P, Keenan DM, Gaesser GA, Veldhuis JD. Effects of continuous versus intermittent exercise, obesity, and gender on growth hormone secretion. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008; 93(12):4711-20.
128. Wilson PW, D'Agostino RB, Sullivan L, Parise H, Kannel WB. Overweight and obesity as determinants of cardiovascular risk. *Arch Intern Med*. 2002; 162(16):1867-72.
129. Wisløff U, Loennechen JP, Currie S, Smith GL, Ellingsen Ø. Aerobic exercise reduces cardiomyocyte hypertrophy and increases contractility,  $\text{Ca}^{+2}$  sensitivity and SERCA-2a in rat after myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2002; 54(1):162-74.

130. Wisloff U, Loennechen JP, Falck G, Beisvag V, Currie S, Smith G, Ellingsen O. Increased contractility and calcium sensitivity in cardiac myocytes isolated from endurance trained rats. *Cardiovasc Res.* 2001; 50(3):495–508.
131. Wong CY, O'Moore-Sullivan T, Leano R, Byrne N, Beller E, Marwick TH. Alterations of left ventricular myocardial characteristics associated with obesity. *Circulation.* 2004; 110(19):3081-7.
132. World Health Organization. Obesity and Overweight. Geneva: WHO. [access 2015 Jan 26]. Available from: <http://www.who.int/en/>
133. Xiao J, Xu T, Li J, Lv D, Chen P, Zhou Q, Xu J. Exercise-induced physiological hypertrophy initiates activation of cardiac progenitor cells. *Int J Clin Exp Pathol* 2014; 7(2):663-9.
134. Xie Y, Grandi E, Puglisi JL, Sato D, Bers DM.  $\beta$ -adrenergic stimulation activates early afterdepolarizations transiently via kinetic mismatch of PKA targets. *J Mol Cell Cardiol.* 2013; 58:153-61.
135. Yamazaki M, Kamitani K, Ito Y, Momose Y. Effects of halothane and diltiazem on ltype calcium currents in single smooth muscle cells from rabbit portal veins. *Br J Anaesth.* 1994; 73(2):209-13.
136. Yeves AM, Villa-Abrille MC, Pérez NG, Medina AJ, Escudero EM, Ennis IL. Physiological cardiac hypertrophy: Critical role of AKT in the prevention of NHE-1 hyperactivity. *J Mol Cell Cardiol.* 2014; 76:186–195.
137. Zarzoso M, Mironov S, Guerrero-Serna G, Willis BC, Pandit SV. Ventricular remodelling in rabbits with sustained high-fat diet. *Acta Physiol.* 2014; 211(1):36-47.
138. Zouhal H, Jacob C, Delamarche P, Gratas-Delamarche A. Catecholamines and the effects of exercise, training and gender. *Sports Med.* 2008; 38(5):401-23.